

黑磷纳米片载药体系的制备及其抗缺血性脑损伤的作用

张媚丽^{1,2}, 张 梦^{1,2}, 殷淑江^{1,2}, 侯 靛^{1,2}, 赵闻天^{1,2}, 田 星^{1,2*}

(1. 石河子大学药学院, 新疆 石河子 832099; 2. 新疆植物药资源利用教育部重点实验室, 新疆 石河子 832099)

摘要: 本研究采用普通液相法制备黑磷纳米片 (black phosphorus nanosheets, BP), 并经聚乙二醇修饰后将白藜芦醇负载于 BP 上, 得 BP 载药体系。采用荧光蛋白标记法考察 BP 的脑靶向性, 并通过 TTC (2,3,5-triphenyltetrazolium chloride) 染色法、神经行为学评价、脑水肿考察等实验研究黑磷载药后抗脑缺血/再灌注脑损伤的作用。使用蛋白免疫印迹分析方法探究 BP 载药体系作用于缺血性脑损伤的分子机制, 采用溶血实验、苏木精-伊红 (hematoxylin-eosin, H&E) 染色实验评估其生物相容性。结果表明, BP 载药能力优异, 其载药体系结构、粒径均一旦释药曲线稳定, 具有优异的光热效应。通过对荧光强度的分析对比, 发现 BP 在近红外光辅助照射条件下可增加血脑屏障通透性, 使药物更多通过血脑屏障。此外, BP 载药体系能明显改善造模后小鼠的神经行为障碍, 脑梗死面积及脑水肿程度显著下降。蛋白免疫印迹分析实验证明, 此载药体系可通过激活抗氧化信号通路蛋白核因子 E2 相关因子 2 (nuclear factor E2-related factor 2, Nrf2)、血红素氧合酶-1 (heme oxygenase-1, HO-1) 的表达, 从而发挥抗缺血性脑损伤作用。BP 载药体系的溶血实验及 H&E 实验结果表明, 其不具有明显毒性, 安全性高。综上, 本研究制备的 BP 载药量高、光热性能良好、安全性高, 在近红外光条件下, 还具有一定的脑靶向能力, 可提高药物在脑部的治疗效果。动物福利和实验过程均遵循石河子大学一附院动物伦理委员会的规定。

关键词: 黑磷; 白藜芦醇; 药物载体; 缺血性脑损伤; 靶向性

中图分类号: R945

文献标识码: A

文章编号: 0513-4870(2022)12-3660-09

Preparation of drug loading system of black phosphorus nanosheets and its anti-ischemic brain injury

ZHANG Mei-li^{1,2}, ZHANG Meng^{1,2}, YIN Shu-jiang^{1,2}, HOU Jing^{1,2}, ZHAO Wen-tian^{1,2},
TIAN Xing^{1,2*}

(1. School of Pharmacy, Shihezi University, Shihezi 832099, China; 2. Xinjiang Key Laboratory of Plant Medicine Resource Utilization of the Ministry of Education, Shihezi 832099, China)

Abstract: In this study, black phosphorus nanosheets (BP) were prepared by the ordinary liquid phase method, and resveratrol was loaded on the BP after being modified by polyethylene glycol. The brain targeting of BP was investigated by fluorescent protein labeling, and the effects of black phosphorus on cerebral ischemia/reperfusion injury were studied by 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride (TTC) staining, neurobehavioral evaluation, and brain edema. Protein immunoblotting analysis was used to explore the molecular mechanism of the BP drug delivery system on ischemic brain injury. Hemolysis test and hematoxylin-eosin (H&E) staining were used to evaluate its biocompatibility. The results showed that BP had excellent drug loading capacity, uniform drug loading system structure and particle size, stable drug release curve, and excellent photothermal effect. Through the analysis and comparison of fluorescence intensity, it was found that BP can increase the permeability of blood-brain barrier (BBB) under the condition of near-infrared light assisted irradiation, and make drugs more pass through the BBB.

收稿日期: 2022-07-25; 修回日期: 2022-08-30.

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81960334); 石河子大学大学生创新创业训练项目 (202210759031).

*通讯作者 Tel: 18290761869, E-mail: 415939026@qq.com

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2022-0902

In addition, the black phosphorus nano tablet drug delivery system can significantly improve the neurobehavioral disorder of mice after modeling, and the cerebral infarction area and brain edema degree are significantly decreased. Western blot experiments showed that the drug delivery system could play an anti-ischemic brain injury role by activating the expression of antioxidant signaling pathway proteins nuclear factor E2-related factor 2 (Nrf2) and heme oxygenase-1 (HO-1). The hemolysis test and H&E test results of the BP drug carrier system showed that it had no obvious toxicity and high safety. In conclusion, the BP prepared in this study had high drug loading, good photothermal performance, and high safety. Under the near-infrared condition, they also have certain brain targeting ability, which can improve the therapeutic effect of drugs in the brain. Animal welfare and experimental procedures were following the regulations of the Animal Ethics Committee of the First Affiliated Hospital of Shihezi University.

Key words: black phosphorus; resveratrol; drug carrier; ischemic brain injury; targeting

脑血管疾病具有极高的死亡率和致残率,是危害人类生命健康最主要的三大疾病之一,是世界重点防治的疾病之一。脑血管疾病有缺血性与出血性两种类型,其中缺血性脑血管病占整个脑血管疾病的60%以上。脑缺血病理过程中,脑血流量的减少使葡萄糖和氧气输送不足,导致三磷酸腺苷(adenosine triphosphate, ATP)水平显著降低。由于ATP缺乏导致钙的快速流入,从而诱发谷氨酸兴奋性毒性、氧化应激和炎症反应,导致不可逆的组织损伤和梗塞^[1]。由于大部分药物无法有效通过血脑屏障(blood-brain barrier, BBB),使得治疗脑卒中的药物少之又少。重组人组织型纤溶酶原激活剂^[2]是目前食品药品监督管理局批准临床治疗该病的唯一药物。但重组人组织型纤溶酶原激活剂的治疗窗非常狭窄,只有7%的患者才有资格接受这种治疗。治疗脑卒中需开发新的方法或递药系统来促进药物有效通过血脑屏障从而达到治疗效果。

黑磷纳米片(black phosphorus nanosheets, BP)即磷烯,具有独特的结构和性质,自2014年首次成功剥离后正在成为后起之秀^[3]。由于与光的强相互作用,BP在近红外区域具有高消光系数、高光热转换效率及高荧光量子产率,在光热疗法、光声成像和荧光成像等领域具有较大的潜能。Sun等^[4]使用简单的液相剥离方法制备出了平均尺寸为 2.6 ± 1.8 nm的BP量子点(black phosphorus quantum dot, BPQD),可通过肾脏快速清除,能避免可能的长期毒性。细胞实验表明,超小型BPQD具有有效的光热杀灭效果和良好的生物相容性。Tao等^[5]发现BP的载药量为108%,远高于传统材料。BP可通过加载药物、靶向分子和荧光分子,实现靶向检测-治疗组合性能和光控药物释放能力^[6]。此外,BP最重要的特征是在生理条件下可降解为磷酸盐^[7],这是体内普遍存在的代谢物。以上研究结果表明,BP具有作为下一代智能载药平台的巨大潜力。

白藜芦醇(resveratrol, RES)是一种多酚类化合物,广泛存在于虎杖、藜芦、葡萄等植物内^[8]。已有研

究表明RES具有抗氧化与清除自由基的药物活性^[9],且对大鼠脑皮层神经元具有较强的神经保护作用^[10],因此,RES是一种较理想的神经保护药物。然而,由于RES难溶于水,且在体内代谢快速,同时大部分进入体循环的药物被BBB所阻挡,从而导致正常给药途径下的RES不具有长效治疗效果^[11]。如何利用现代药剂学手段提高RES溶解度和生物利用度已成为一个备受关注的问题。

因此,本实验设计通过液相剥离法制备低层且尺寸均匀的BP,使其具备一定的BBB透过性,同时经聚乙二醇(polyethylene glycol, PEG)修饰后提高其脑靶向能力,连接RES构建出完整的脑靶向BP载药体系。采用小鼠大脑中动脉栓塞再灌注模型,探究不同剂型下RES对小鼠脑缺血/再灌注后氧化应激损伤的神经保护作用,为BP的脑疾病应用开发和临床使用提供实验和理论依据。

材料与方法

药品与试剂 黑磷粉末(南京先丰纳米材料科技有限公司);N-甲基吡咯烷酮(*N*-methylpyrrolidone, NMP,上海麦克林生化科技有限公司);RES、肝素钠(安徽泽升科技有限公司);PEG-NH₂、荧光蛋白Cy5.5(Cy5.5-PEG-NH₂)(广州市碳水科技有限公司);NaHCO₃、EDTA·2Na(天津市盛奥化学试剂有限公司);无水乙醇(天津市风船化学试剂科技有限公司);生理盐水(四川科伦药业股份有限公司);磷酸盐缓冲液(PBS)、苏木精-伊红(hematoxylin-eosin, H&E)染色试剂盒、4×蛋白上样缓冲液、RIPA裂解液、牛血清白蛋白(BSA)、Tris、SDS(sodium dodecyl sulfate)、甘氨酸、30%制胶液、TTC(2,3,5-triphenyltetrazolium chloride)(北京索莱宝科技有限公司);手术器械及线栓(北京西浓科技有限公司);抗体Nrf2(nuclear factor E2-related factor 2)及HO-1(heme oxygenase-1)(武汉三鹰生物技术有限公司);氟化聚偏乙烯(PVDF)微孔转移膜(Millipore

公司); 四甲基乙二胺 (TEMED, Sigma 公司)。

仪器 冷冻离心机 (赛默飞世尔科技有限公司); 超纯水机 (德国默克密理博公司); 细胞破碎仪 (南京雪莱生物科技有限公司); 冷冻干燥机 (上海胜卫电子科技有限公司); 酶标仪 (Thermo 公司); HH-2 数显恒温水浴锅 (金坛市晶玻实验仪器厂); 石蜡包埋机 (上海寰熙医疗器械有限公司); 石蜡切片机 (孝感市亚光医用电子技术有限公司); Axio Imager A 蔡司正置荧光显微镜 (北京冠普佳科技有限公司); 小动物活体成像仪 (广州博鹭腾生物科技有限公司); 激光多普勒血流检测仪 (深圳市瑞沃德生命科技有限公司)。

动物 SPF 级雄性昆明种小鼠, 6~8 周龄, 体重为 25 ± 5 g, 购于新疆医科大学动物中心, 使其在适宜环境下适应性饲养 1 周, 自由饮水和食物。本实验所用动物保护指南是由石河子大学一附院动物保护委员会所制定。动物福利和实验过程均遵循石河子大学一附院动物伦理委员会的规定。

BP 的制备 取预先 -20 °C 保存的研钵, 置于冰上, 加入 100 μ L 冰 NMP。称取黑磷粉末 30 mg, 放入研钵中, 避光低温研磨 1 h, 将研磨后的混悬液转移至 EP 管中, 加入冰 NMP 定容至 30 mL。将所得黑磷混悬液分为 8 组, 在 500 W 超声机中分别用冰水浴避光超声, 期间不断换水保证低温状态, 随后在细胞破碎仪中以 500 W 功率继续超声 1 h。完成后取出混悬液, 4 °C 下静置过夜。取静置后的混悬液上层, 在 $2\ 000$ $r \cdot \text{min}^{-1}$ 、 4 °C 条件下离心 5 min, 取上层液, 经 2 次 $15\ 000$ $r \cdot \text{min}^{-1}$ 、 4 °C 离心 5 min 后将 NMP 置换为等体积的超纯水, 即得 BP 混悬液。

BP 的 PEG 修饰及载药 取 BP 混悬液 5 mL, 加入 10 倍黑磷重量的 PEG-NH₂ (相对分子质量 3 400), 涡旋 5 min 混匀, 500 W 超声 30 min 后于 300 $r \cdot \text{min}^{-1}$ 、 4 °C 避光振摇 24 h, 完毕后以 $12\ 000$ $r \cdot \text{min}^{-1}$ 、 4 °C 离心 10 min, 去除上清液即得 PEG 修饰后的 BP (BP-PEG), 将其重悬于 PBS 中并存于 4 °C。取适量 RES, 用无水乙醇溶解, 将 BP-PEG 混悬液以 $12\ 000$ $r \cdot \text{min}^{-1}$ 、 4 °C 离心 10 min 后去除上清液, 加入 RES 溶液, 300 $r \cdot \text{min}^{-1}$ 、 4 °C 避光振摇 48 h 后, 以 $10\ 000$ $r \cdot \text{min}^{-1}$ 、 4 °C 离心 10 min, 收集上清液用于评估 BP 的载药量, 加入超纯水重新混悬即得黑磷载白藜芦醇 (BP-PEG-RES) 溶液。

BP 的光热效应研究 实验分为空白组、1W 组、2W 组。空白组吸取 1 mL 超纯水置于 EP 管中, 1W 组、2W 组则取用 1 mL BP 混悬液, 将 EP 管于 4 °C 下严密封存过夜。调节近红外激光发射器功率至 1 $W \cdot \text{cm}^{-2}$ 并将发射头调至 EP 管上方 3 cm 处, 照射空白组、1W 组, 并于 1、3、5、7、9、10 min 记录温度数据。2W 组调节近

红外激光发射器功率至 2 $W \cdot \text{cm}^{-2}$ 重复上述实验。

体外释药实验 实验分为 RES 组、BP-PEG-RES 组、BP-PEG-RES+近红外 (near-infrared, NIR) 照射组。将上述溶液添加至透析袋中, 使用封口器夹住透析袋两侧, 其中 BP-PEG-RES+NIR 组在透析过程开始前进行 808 nm、 2 $W \cdot \text{cm}^{-2}$ 、10 min 的近红外光照射。将 3 组同时放置于装有 99 mL 超纯水的烧杯中, 于 50 $r \cdot \text{min}^{-1}$ 、 37 °C 摇床中孵育。分别于 1、5、30 min 和 1、2、4、8、12、24 h 时吸取 1 mL 外部溶液 (收集完成后及时补液), 并评估 306 nm 处的吸光度 (*A*) 值以量化 RES 释放量, 按公式 (1) 计算各时间点的药物释放率。

$$\text{药物释放率} = \text{药物释放量} / \text{总载药量} \quad (1)$$

黑磷载药体系脑靶向性考察 根据“BP 的 PEG 修饰及载药”项的方法使黑磷连接荧光蛋白 Cy5.5, 获得 BP-PEG-Cy5.5。随机挑选体重为 25 ± 5 g 的雄性小鼠分为 3 组并标记。① 空白对照组: 尾静脉注射 5 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ Cy5.5 荧光蛋白; ② BP-PEG-Cy5.5 组: 尾静脉注射 5 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ Cy5.5 剂量的 BP-PEG-Cy5.5; ③ BP-PEG-Cy5.5+NIR 组: 尾静脉注射 5 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ Cy5.5 剂量的 BP-PEG-Cy5.5, 注射后立即照射 808 nm、 2 $W \cdot \text{cm}^{-2}$ 的 NIR 10 min。分别于给药后 1、2、3、6、12、24 h 进行小动物活体成像并拍照观察。重复实验并于 6 h 时处死小鼠, 解剖收集心、肝、脾、肺、肾、脑组织进行小动物活体成像拍照, 使用 Image J 图像处理软件处理结果。

黑磷载药体系抗缺血性脑损伤能力考察

构建小鼠缺血性脑损伤 (MCAO) 模型 随机挑选体重为 25 ± 5 g 的雄性小鼠分为 4 组并标记: ① 假手术空白组; ② MCAO 再灌注造模组; ③ RES 组: MCAO 再灌注造模后, 立即尾静脉注射 30 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ RES 混悬液并照射 808 nm、 2 $W \cdot \text{cm}^{-2}$ 的 NIR 10 min; ④ BP-PEG-RES 组: MCAO 再灌注造模后立即尾静脉注射 30 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ RES 剂量的 BP-PEG-RES 混悬液 (PBS) 并照射 808 nm、 2 $W \cdot \text{cm}^{-2}$ 的 NIR 10 min。

行为学评价 于手术后 24 h 观察小鼠行为, 按照 Longa 等^[12]评分标准, 0 分为正常表现, 无神经行为学特征表现; 1 分为小鼠在俯卧体位下不能完全伸展左侧前肢; 2 分为小鼠出现左侧肢体瘫痪状态, 自主行走时有向左侧伏倒倾向, 同时较常出现追尾现象; 3 分为小鼠行走时向左侧伏倒, 或小鼠不能独自站立且偶有向一侧翻滚的表现; 4 分为无自主活动意识, 出现行为障碍。各组分别于术后 24 h 进行行为学评分。

脑含水量 术后 24 h 断头取脑, 称定湿重, 100 °C 烘箱干燥 24 h 后称定干重, 通过公式 (2) 计算各组脑含水量。

$$\text{脑含水量} (\%) = (C_{\text{湿重}} - C_{\text{干重}}) / C_{\text{湿重}} \times 100\% \quad (2)$$

其中, $C_{\text{湿重}}$ 、 $C_{\text{干重}}$ 分别表示脑组织烘烤前后的重量 (mg)。

TTC 染色 术后 24 h 断头取脑, 立即放置于 -80°C 冷冻 30 min, 用刀片将脑组织均匀切成 5 片, 浸润在 2% TTC 溶液中, 避光 37°C 孵育 30 min, 期间每隔 5 min 翻动 1 次。孵育完毕后, 取出组织, 使用超纯水冲洗后用多聚甲醛固定 12 h, 观察并拍照。以 Image J 图像分析软件对图像进行分析。

蛋白免疫印迹分析 (Western blot) 上述各组于再灌注 24 h 后断头取脑, 使用干净刀片取损伤侧脑组织并称重, 按比例加入蛋白裂解缓冲液, 用冰水浴球磨机匀浆 5 min, 随后冰上孵育 30 min, 经 $12\ 000\ \text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 、 4°C 条件冷冻离心 5 min, 取上清液 1 mL 测脑组织总蛋白, 按比例加入蛋白上样缓冲液与电泳缓冲液, 煮沸 10 min。经 10% 变性聚丙烯酰胺凝胶垂直电泳, 通过湿转法将目标蛋白转移至硝酸纤维素膜上, 使用 5% BSA 于 4°C 条件下封闭 2 h, 随后加入抗 Nrf2、HO-1 及 β -actin 一抗, 25°C 孵育 30 min, 并经 4°C 过夜孵育后加入二抗 25°C 孵育 2 h, 经 ChemiDocXPS 发光系统显影。拍照并使用 Image J 图像分析软件对图像进行分析, 以目的条带与 β -actin 条带光密度的比值作为目标蛋白的相对表达含量。

BP 及其载药制剂的溶血性考察 随机挑选雄性小鼠, 取小鼠血液制成 4% 的红细胞悬液。取 EP 管, 向其中加入 100 μL 红细胞悬液备用。溶血实验分为 5 组, 分别为: ① 阳性组: 向管中加入 100 μL 超纯水; ② 阴性组: 向管中加入 100 μL 的 PBS; ③ RES 组: 分别向管中加入 100 μL 低、中、高浓度的 RES 溶液; ④ BP 组: 分别向管中加入 100 μL 低、中、高浓度的 BP 混悬液; ⑤ BP-PEG-RES 组: 分别向管中加入 100 μL 低、中、高浓度的 BP-PEG-RES 混悬液。其中低、中、高剂量组浓度均为 2.25、4.5、9 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。各组于 37°C 孵育 3 h 后加入 800 μL PBS, 轻摇混匀后, 以 $2\ 500\ \text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 、 4°C 条件离心 5 min, 精密吸取 200 μL 上清液于 96 孔板中, 使用酶标仪检测 540 nm 处的吸光度。采用公式 (3) 计算溶血率 (hemolysis, %):

$$\text{溶血率}(\%) = (A_t - A_{nc}) / (A_{pc} - A_{nc}) \times 100\% \quad (3)$$

其中, A_t 为实验溶液吸光度值, A_{nc} 为阴性对照组吸光度值, A_{pc} 为阳性对照组吸光度值。

组织病理学观察 随机挑选体重为 $25 \pm 5\ \text{g}$ 的雄性小鼠并标号。实验分 4 组: ① 空白对照组; ② RES 组; ③ BP 组; ④ BP-PEG-RES 组。给药组每天定时分别通过尾静脉注射 30 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ RES、BP 与 BP-PEG-RES (RES 剂量) 0.2 mL, 空白对照组注射等体积的 PBS。一周后处死, 解剖并分离出心、肝、脾、肺、肾组织, 固

定、上蜡、包埋成蜡块、切片、脱蜡、染色, 并用光学显微镜进行形态学观察。

统计学分析 数据表示为均值 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$), 采用 SPSS 24.0 软件进行统计分析, 两组间比较采用独立样本 t 检验, $P < 0.05$ 表示数据差异具有统计学意义。

结果

1 BP 及其载药制剂的表征研究

为了确定最佳超声时间, 本实验通过对不同超声时间下黑磷混悬液的取样并考察粒径。其中, 黑磷研磨后在超声 5 h 前的粒径大小随着超声时间增加而急剧下降, 在超声 6 h 后粒径变化差异减小, 表明超声时间总时长控制在 6 h 时即可获得粒径尺寸小于 300 nm 的 BP (图 1A)。

为探究不同药物浓度与 BP 浓度比例对总体载药率的影响, 通过分别给予 BP 浓度的 1、2、3、4、5 倍的 RES 剂量载药。结果表明, 当 RES:BP = 3:1 时, 载药率达到最高 ($P < 0.01$, 图 1B)。

对 BP 和经 PEG 修饰及载药后的制剂进行表征, 首先采用马尔文粒度仪考察 3 种状态的粒径尺寸及 zeta 电位的变化, 其中 BP 经 PEG 修饰后无明显体积变化, 在载药后发生堆叠聚合导致马尔文测得粒径尺寸偏大 (图 1C), 而 BP 在经过 PEG 修饰后稳定性增加, 但在完全载药后, 稳定性有所下降 (图 1D)。对制剂进行电镜观察, 结果表明, 黑磷经过 6 h 超声后具有低层数片状结构, 分散性良好, PEG 修饰及载药后载药点明显, 总体尺寸平均, 层状结构未变化 (图 2A~D)。

为评估制备的 BP 的光热反应能, 考察了不同功率下的近红外激光照射对于 BP 混悬液温度的影响, 结果表明, 与空白组相比, 1 $\text{W}\cdot\text{cm}^{-2}$ 功率照射 10 min 的 BP 温度显著提高 ($P < 0.01$); 与空白组和 1W 组相比, 2 $\text{W}\cdot\text{cm}^{-2}$ 功率照射 10 min 温度显著提高 ($P < 0.01$) (图 2E)。体外释药结果表明, RES 可在 1 h 内可完全溶解于透析袋外溶液之中, 而 NIR 照射能显著提高 BP 的释药能力 ($P < 0.01$, 图 2F)。

2 NIR 对 BP 脑靶向能力的影响

为研究 NIR 照射对 BP 脑靶向能力的影响, 采用荧光标记法考察了 BP 在 NIR 照射条件下的血脑屏障透过性及脑靶向性的差异, 通过体内各时间点荧光强度对比结果 (图 3), 发现小鼠在 6 h 时的脑部荧光强度最高, 所以选择 6 h 时间点小鼠进行解剖并进行各组织荧光强度分析 (图 4A)。通过对各组织荧光强度的统计分析, 结果表明 (图 4B), BP 具有一定的血脑屏障透过性及脑靶向性 ($P < 0.01$), 而 NIR 照射能显著提高其脑靶向性 ($P < 0.01$)。

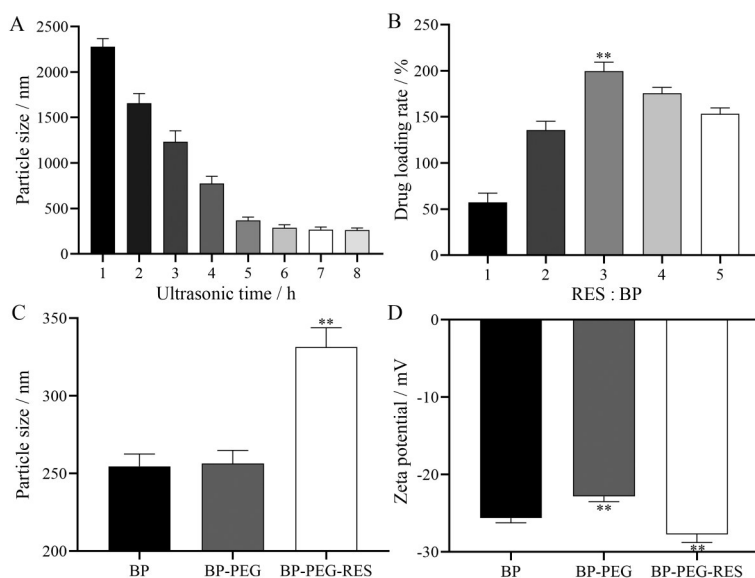


Figure 1 A: Effect of ultrasonic time on the particle size of black phosphorus nanosheets (BP). B: Effects of different concentrations and concentrations rate of BP on drug loading rate (w/w, %). ** $P < 0.01$ vs RES:BP = 1. C: Effect of PEG modification and drug loading on the particle size of BP. D: Effect of polyethylene glycol (PEG) modification and drug loading on the stability of BP. ** $P < 0.01$ vs BP. $n = 3$, $\bar{x} \pm s$. RES: Resveratrol

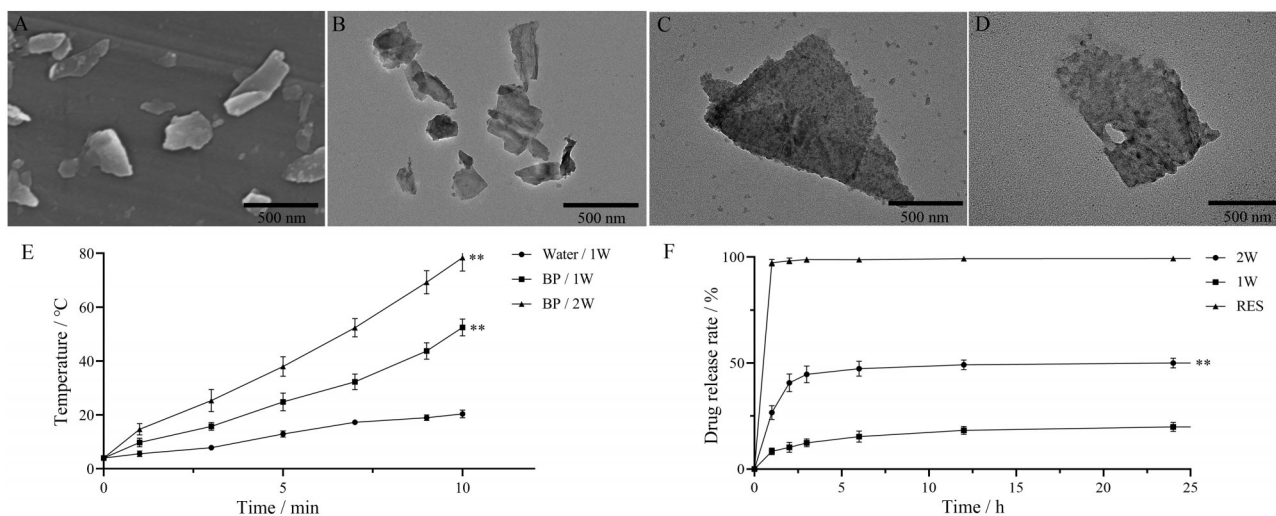


Figure 2 Electron microscopic observation of BP modified with PEG and before and after drug loading. A: Scanning electron microscope (SEM) of BP; B: Transmission electron microscope (TEM) of BP; C: BP modified by PEG; D: BP after drug loading. Scale bar: 500 nm; E: Effect of near-infrared (NIR) light irradiation on the temperature of BP. ** $P < 0.01$ vs water/1W; F: Effect of NIR irradiation on drug release rate of BP. ** $P < 0.01$ vs RES. $n = 3$, $\bar{x} \pm s$

3 黑磷载药体系抗缺血性脑损伤能力考察

3.1 不同给药组对小鼠脑梗死面积的影响 为考察不同给药组脑部梗死面积的差异性, 对各组小鼠脑组织进行 TTC 染色, 通过 Image J 软件对图片进行分析处理, 结果表明 (图 5A、B), 小鼠 MCAO 造模再灌注 24 h 后, 造模组缺血侧脑组织有明显的梗死现象, 与模型组相比, RES 组及 BP-PEG-RES 组脑梗死体积明显缩小 ($P < 0.01$), BP-PEG-RES 组脑梗死面积显著小于 RES

组 ($P < 0.01$)。

3.2 不同给药组对小鼠神经行为的影响 为研究黑磷载药体系对小鼠 MCAO 造模后的神经行为学的改善程度, 对不同组的小鼠进行行为学评分, 结果表明 (图 5C), 与空白组比较, 模型组小鼠术后 24 h 出现明显的神经行为障碍 ($P < 0.01$); RES 组及 BP-PEG-RES 组小鼠仍有神经行为障碍症状, 但与模型组比较, RES 组能改善小鼠神经行为障碍症状 ($P < 0.05$), 而 BP-

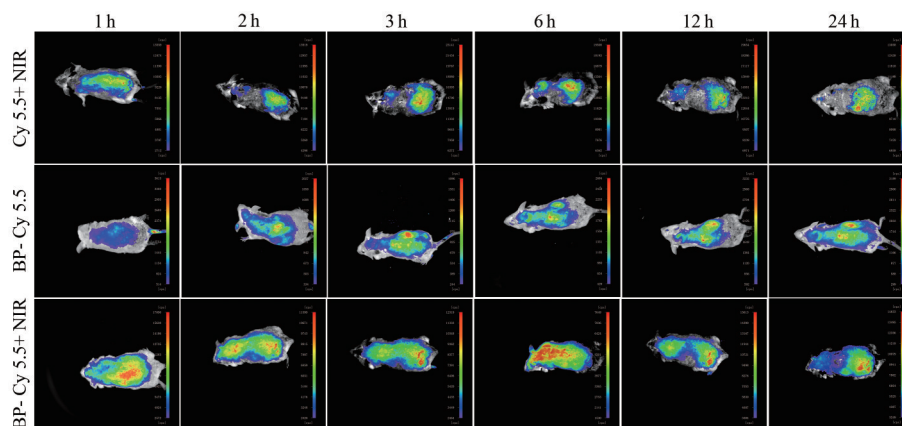


Figure 3 Fluorescence imaging results at different time points in each group

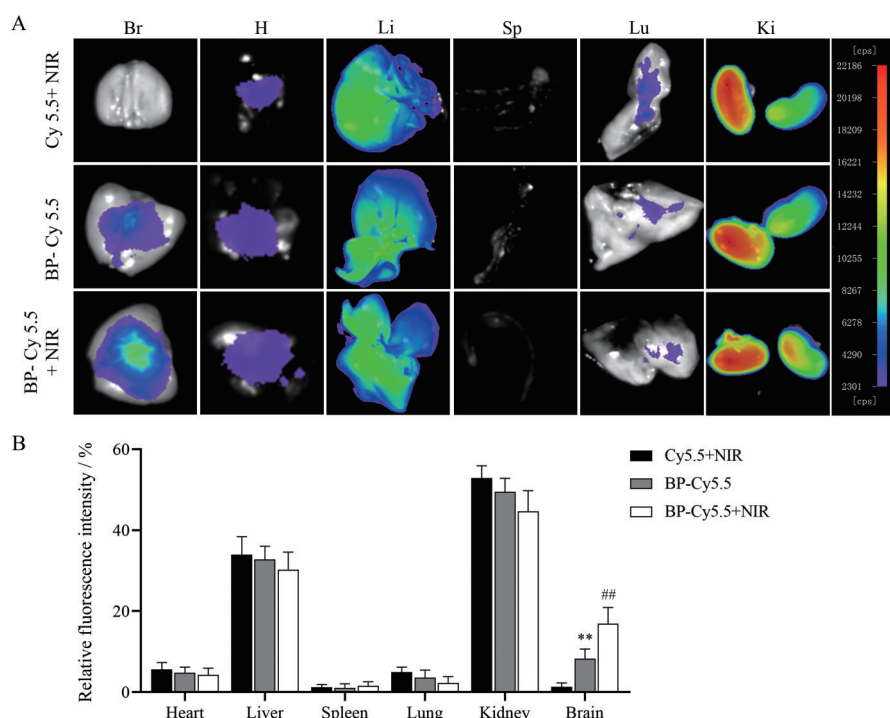


Figure 4 Fluorescence signals of main organs of mice at 6 h after injection. A: Fluorescence imaging of main organs; B: Fluorescence intensity of main organs. ** $P < 0.01$ vs Cy5.5 + NIR; ## $P < 0.01$ vs BP-Cy5.5. $n = 3, \bar{x} \pm s$

PEG-RES 组能显著降低小鼠神经行为障碍 ($P < 0.01$)。

3.3 不同处理组对小鼠脑含水量的影响 为研究各组脑含水量的差异, 将各组小鼠脑组织进行干燥称重, 对比结果表明, 与空白组比较, 模型组小鼠术后 24 h 缺血侧脑组织含水量明显增加 ($P < 0.01$); 与模型组比较, RES 组及 BP-PEG-RES 组小鼠脑组织含水量均明显减轻 ($P < 0.01$), 且 BP-PEG-RES 组治疗效果明显高于 RES 组 (图 5D)。

3.4 蛋白免疫印迹分析 为考察各组小鼠脑组织中 Nrf2、HO-1 蛋白表达的差异, 通过 Western blot 实验进行分析, 并通过 Image J 软件处理结果。结果表明 (图 6), 与空白组比较, 模型组 Nrf2、HO-1 蛋白表达明显增

高 ($P < 0.01$), 与模型组比较, RES 组与 BP-PEG-RES 组 Nrf2、HO-1 蛋白表达明显增高 ($P < 0.01$), 且 BP-PEG-RES 组 Nrf2、HO-1 蛋白表达明显高于 RES 组 ($P < 0.01$)。

4 BP 及其载药体系安全性评价

4.1 BP 及其载药体系的溶血性考察 为评估 RES、BP 与 BP-PEG-RES 的溶血能力, 分别考察了其低、中、高浓度 ($2.25, 4.5, 9 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$) 下的溶血性质。通过观察可发现, 除阳性组具有明显变色外, 其他组别上清液呈透明无色状态, 通过对比各组 A 值结果, 表明 RES、BP、BP-PEG-RES 在低、中、高浓度下均不表现出明显的溶血性 (图 7)。

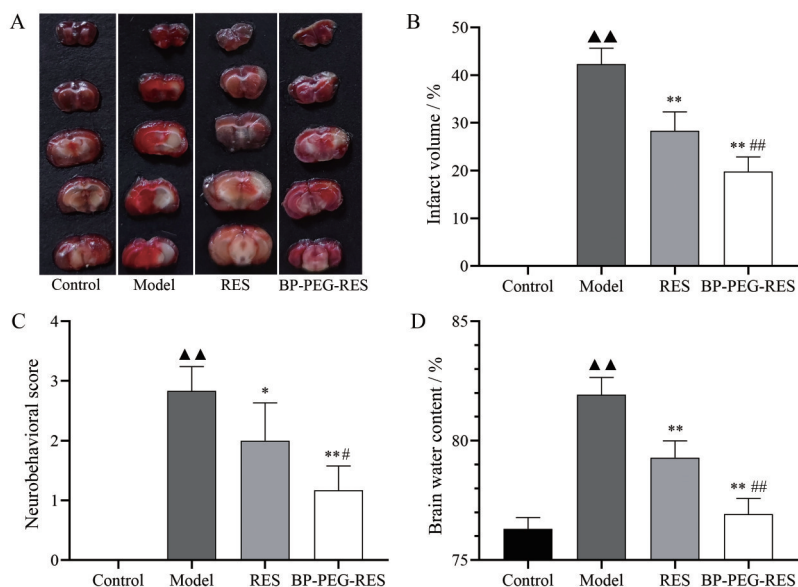


Figure 5 A: 2,3,5-Triphenyltetrazolium chloride (TTC) staining results of each group. B: Effect of each group on cerebral infarct volume. C: The effect of administration on postoperative neurobehavior of mice. D: Effect of each group on brain water content. $n = 6, \bar{x} \pm s$. ▲▲ $P < 0.01$ vs control; * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs model; # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$ vs RES

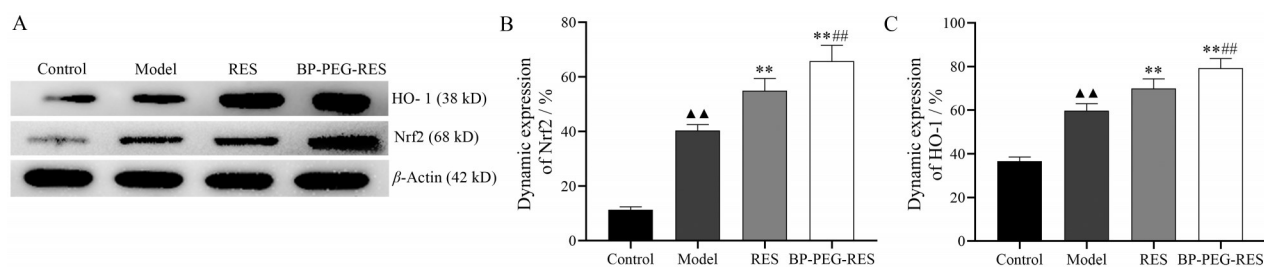


Figure 6 A: Nrf2 and HO-1 protein expressions in brain tissues of mice in each group. B, C: Effects of different treatment groups on Nrf2 and HO-1 protein expression in mouse brain tissues. $n = 3, \bar{x} \pm s$. ▲▲ $P < 0.01$ vs control; ** $P < 0.01$ vs model; ### $P < 0.01$ vs RES

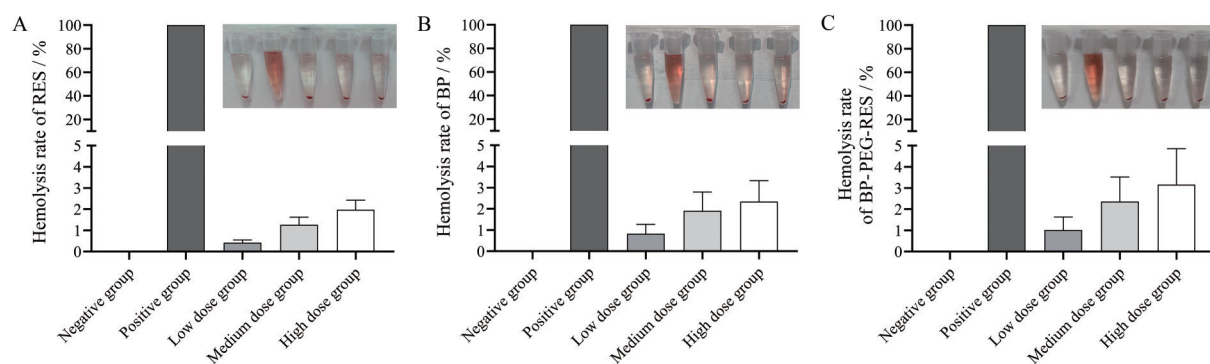


Figure 7 Effects of different concentrations of each component on hemolysis test results. A: Hemolysis rate of RES; B: Hemolysis rate of BP; C: Hemolysis rate of BP-PEG-RES. $n = 6, \bar{x} \pm s$

4.2 组织病理染色结果 为考察各组分在最高给药剂量下的组织毒性, 考察了在最大给药剂量连续注射1周后的RES、BP及BP-PEG-RES的生物安全性, 结果表明, 在1周时间内的每天连续注射最大剂量的RES、BP及BP-PEG-RES不会产生明显的组织毒性(图8)。

讨论

为了改善RES的低溶解度和体内半衰期短的缺点, 提高其生物利用度, 同时进一步开发神经保护剂应用于脑部疾病的前景, 本研究设计了一种具有优异的脑部给药潜力的二维纳米材料—BP载药体系。该体

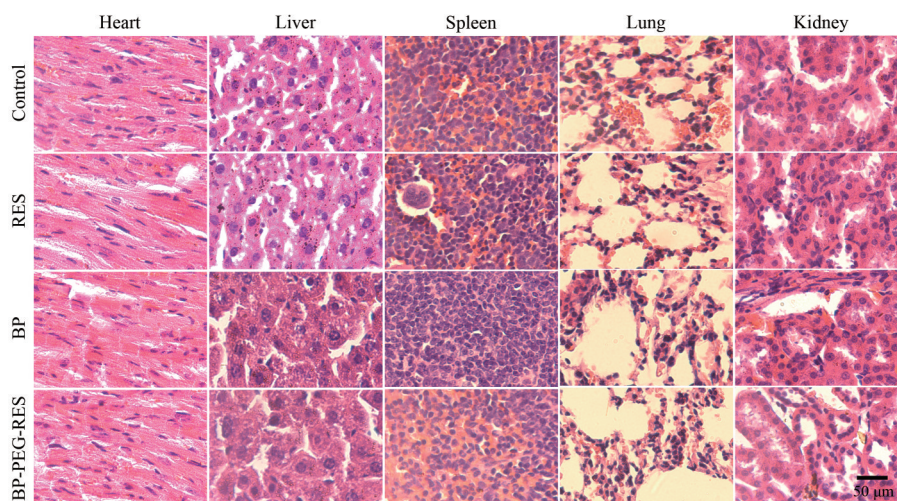


Figure 8 The effect of each component on the hematoxylin-eosin (H&E) staining results of each tissue after one week of injection. Scale bar: 50 μm

系利用静电吸附原理将 PEG 和 RES 分子功能化修饰到带负电荷的 BP 的表面构建而成, 并可通过 BP 的光热效应对药物释放进行控制, 通过近红外光辅助的靶向效果提高药物在脑部的治疗水平, 降低用药风险。

本研究经过体内、外实验, 表明了: ① BP-PEG-RES 具备近红外光响应性控制释放能力, 在近红外光照条件下, 可显著提高 RES 的释放效率, 具备改善 RES 在体内的药物代谢动力学特点; ② 体内小动物活体荧光成像实验表明, 由于 BP 具有光热效应, 在近红外光照射的辅助条件下, 可增加 BBB 通透性, 使得该载药体系具备提高 RES 在脑部的治疗效果的能力; ③ 体内造模实验证实了 BP-PEG-RES 具有优于直接给药的治疗效果; ④ 溶血实验与组织病理染色结果表明 BP 具有良好的生物相容性, 且有大量研究验证, BP 在体内可被降解为磷酸盐^[13], 这些都佐证了该载药体系具有良好的生物安全性。

基于本研究, 后续有更多工作有待进一步讨论研究。首先, BP 在载药后稳定性有所下降, 在室温条件下即可发生部分团聚, 且在与空气接触后易发生氧化而导致结构破坏, 但黑磷的大部分优点都基于其低层数的纳米片状结构基础, 因此, 如何提高 BP 的稳定性需进一步探讨。其次, BP 脑靶向性大部分来自于近红外光的介导, 只是一种有限的被动靶向方式, 且近红外光对头骨的穿透效果有一定限制, 而发热反应也会降低患者顺应性, 需要一种更高效的主动靶向以降低 BP 被网状内皮系统摄取的程度, 从而增加药物进入脑组织的治疗浓度。最后, 虽然在短期内使用黑磷不会出现明显的组织毒性, 但脑卒中作为一种病程较长的疾病, 长期用药条件下黑磷的生物安全性需进一步考察,

这也是该载药体系向临床转化的一个重点考察。

综上所述, 该载药体系如成功向临床转化将不仅可负载 RES 用于手术再通后的缺血性脑损伤, 更重要的是, 其或许可作为药物的通用载体负载治疗其他疾病的药物用于目标疾病的靶向治疗, 成为治疗其他脑部疾病的一种新策略。

作者贡献: 田星、张媚丽负责提出研究选题、实验思路及设计研究方案; 张媚丽、张梦、殷淑江、侯靓、赵闻天负责实验研究过程; 殷淑江、侯靓、赵闻天负责材料支持及采集整理数据; 张媚丽负责起草、修改论文; 田星负责技术指导及论文最终版本修订。

利益冲突: 本研究不存在研究者与公开研究成果有关的利益冲突。

References

- [1] Wesley UV, Bhute VJ, Hatcher JF, et al. Local and systemic metabolic alterations in brain, plasma, and liver of rats in response to aging and ischemic stroke, as detected by nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopy [J]. *Neurochem Int*, 2019, 127: 113-124.
- [2] Tang S, He Z, Liang G, et al. Pulse duration dependent nonlinear optical response in black phosphorus dispersions [J]. *Optics Commun*, 2018, 406: 244-248.
- [3] Yan ZQ, Zhang W. The development of graphene-based devices for cell biology research [J]. *Front Mater Sci*, 2014, 8: 107-122.
- [4] Sun ZB, Xie HH, Tang SY, et al. Ultrasmall black phosphorus quantum dots: synthesis and use as photothermal agents [J]. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2015, 127: 11688-11692.
- [5] Tao W, Zhu X, Yu X, et al. Black phosphorus nanosheets as a robust delivery platform for cancer theranostics [J]. *Adv Mater*, 2017, 29: 271-276.

- [6] Li XM, Li JY, Zhang X, et al. Research and application of nanometer black phosphorus in phototherapy and drug carrier [J]. Acta Pharm Sin (药 学 学 报), 2021, 56: 178-189.
- [7] Shao JD, Xie HH, Huang H, et al. Author Correction: Biodegradable black phosphorus-based nanospheres for *in vivo* photothermal cancer therapy [J]. Nat Commun, 2021, 12: 3923.
- [8] Keylor MH, Matsuura BS, Stephenson CR. Chemistry and biology of resveratrol-derived natural products [J]. Chem Rev, 2015, 115: 8976-9027.
- [9] Ozkan OV, Yuzbasioglu MF, Ciralik H, et al. Resveratrol, a natural antioxidant, attenuates intestinal ischemia/reperfusion injury in rats [J]. Tohoku J Exp Med, 2009, 218: 251-258.
- [10] Gao Y, Liu WD, Ruan BF. Synthesis and neuroprotective activity of resveratrol-3-*n*-butylphthalide hybrids [J]. Acta Pharm Sin (药 学 学 报), 2019, 54, 1461-1469.
- [11] Walle T, Hsieh F, DeLegge MH, et al. High absorption but very low bioavailability of oral resveratrol in humans [J]. Drug Metab Dispos, 2004, 32: 1377-1382.
- [12] Longa EZ, Weinstein PR, Carlson S, et al. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats [J]. Stroke, 1989, 20: 84-91.
- [13] Ren X, Li Z, Huang Z, et al. Environmentally robust black phosphorus nanosheets in solution: application for self-powered photodetector [J]. Adv Funct Mater, 2017, 27: 8-16.