

· 实验研究 ·

靶向纳米载体包封西地那非对肺高压大鼠
肺血管重构的影响

祝玉玲 俞春芳 孙青 杨军 缪明星 何伟 李冰冰

【摘要】 目的 观察包封西地那非的靶向纳米载体对野百合碱肺高压大鼠肺动脉压力、肺小血管中膜增殖以及右心室心肌肥厚的治疗作用。**方法** 雄性 SD 大鼠 42 只,随机分为六组,每组 7 只。除对照组(CON 组)外,其余各组皮下注射野百合碱 60 mg/kg,4 周后分别经尾静脉注射西地那非 8 mg/kg(SIL 组)、靶向纳米空载体(GL 组)、普通纳米载体包封西地那非(L-SIL 组)和靶向纳米载体包封西地那非(GL-SIL 组)干预 2 周,CON 组与模型组(MCT 组)则给予等体积的生理盐水。2 周后,开胸测量大鼠平均肺动脉压(mPAP)并处死动物取心肺组织,进行 HE 染色,测定肺小血管中膜厚度比例(WT),右心室心肌细胞的面积。采用免疫组织化学法检测肺血管中膜 α -平滑肌肌动蛋白(α -SMA)含量。采用活体荧光示踪观察靶向纳米载体的组织分布。**结果** 与 CON 组比较,MCT 组、GL 组、SIL 组和 L-SIL 组 mPAP 明显升高($P < 0.05$)。与 MCT 组比较,GL-SIL 组 mPAP 明显降低($P < 0.05$)。与 CON 组比较,MCT 组、SIL 组、GL 组和 L-SIL 组 WT 明显增加($P < 0.05$), α -SMA 表达明显增高($P < 0.05$)。与 MCT 组比较,GL-SIL 组 WT 和 α -SMA 的表达明显降低($P < 0.05$)。与 CON 组比较,MCT 组、SIL 组、GL 组和 L-SIL 组心肌细胞面积明显增大($P < 0.05$)。但 GL-SIL 组明显小于 MCT 组($P < 0.05$)。**结论** 靶向纳米载体包封西地那非可明显降低肺动脉高压大鼠的平均肺动脉压力,改善肺血管中膜增殖和右心室肥大,与其具有良好的肺组织靶向性相关。

【关键词】 肺动脉高压;纳米载体;西地那非

Effect of targeted nanoparticles embedded with sildenafil on the vascular remodeling in rats with pulmonary arterial hypertension ZHU Yuling, YU Chunfang, SUN Qing, YANG Jun, MIAO Mingxing, HE Wei, LI Bingbing. Department of Anesthesiology, Nanjing Drum Tower Hospital, the Affiliated Hospital of Nanjing University Medical School, Nanjing 210008, China
Corresponding author: LI Bingbing, Email: icecolor@163.com

【Abstract】 Objective To explore the possible efficacy of glucose modified nanoparticles embedded with sildenafil on amelioration of pulmonary hypertension and pulmonary vascular remodeling in rats treated with monocrotaline. **Methods** Forty-two male Sprague-Dawley rats were randomly divided into 6 groups with 7 rats for each group. All rats, except in Control group (group CON), were subjected to 60 mg/kg monocrotaline subcutaneous injection. After 4 weeks MCT insult, the rats received intravenous injection of sildenafil 8 mg/kg (group SIL), glucose modified nanoparticles (group GL), conventional nanoparticles embedded with sildenafil (group L-SIL), glucose modified-nanoparticles embedded with sildenafil (group GL-SIL) every other day for 2 weeks. The same volume of normal saline was substituted for drugs in the groups CON and MCT. The right lower lobes of the lungs were fixed in neutralformaldehyde for morphometric analysis and assessment of the medial thickness of pulmonary arterioles wall. The expressions of α -smooth muscle actin (α -SMA) were detected with immunohistochemistry assay. The cardiomyocyte volume of right ventricle was also measured under the high-resolution microscope. Ex vivo fluorescence imaging of DiR-loaded nanoparticles in the main tissues collected from rats at 4 h after intravenous injection. **Results** Compared with group CON, the mPAP, WT, expressions of α -SMA and cardiomyocyte volume of right ventricle in groups MCT, SIL, GL and L-SIL were significantly increased ($P < 0.05$). Compared with group MCT, the mPAP, WT, expressions of α -SMA and cardiomyocyte volume of right ventricle in group GL-SIL were significantly reduced ($P < 0.05$). The intensity of fluorescent of lung tissue was

DOI:10.12089/jca.2018.12.018

基金项目:国家自然科学基金(81470242);江苏省六大人才高峰(2016-WSN-147);南京市卫生青年人才培养工程(QRX17013)

作者单位:210008 南京大学医学院附属鼓楼医院麻醉科(祝玉玲、俞春芳、孙青、李冰冰);病理科(杨军);中国药科大学(缪明星、何伟)

通信作者:李冰冰,Email:icecolor@163.com

higher in DiR-loaded glucose modified nanoparticles compared with conventional nanoparticles after 4 h injection. **Conclusion** Glucose modified nanoparticles embedded sildenafil can effectively inhibit the increase in mPAP, percentage of medial thickening and cardiomyocyte hypertrophy of right ventricle induced by MCT in rats, which might be associated with high affinity to lung of targeted nanoparticles and high efficiency drug-delivery system.

【Key words】 Pulmonary arterial hypertension; Nanoparticles; Sildenafil

肺动脉高压(pulmonary arterial hypertension, PAH)是肺血管的一种增殖性病变,常伴有血管内膜损伤和肌性动脉中膜增厚,最终引起管腔狭窄和弹性下降,晚期导致右心功能衰竭^[1]。如何抑制血管中膜平滑肌细胞的过度增殖、促进细胞凋亡是逆转肺血管病变的关键。目前临床治疗 PAH 的西地那非、前列环素类药物在一定程度上能扩张肺动脉、抑制细胞增殖促进凋亡,缓解血管炎症反应,但是并不能改善患者的活动耐力和长期生存率^[2],可能与药物不能在肺组织损伤血管部位达到有效的治疗浓度密切相关。

近年来,靶向纳米材料包封化疗药物在抗肿瘤治疗中发挥了显著的作用,通过在纳米颗粒表面设计肿瘤细胞特征分子的配体,促进纳米颗粒与肿瘤细胞的特异性结合,从而实现肿瘤的靶向治疗,减少全身不良反应^[3]。研究表明肺高压模型肺小动脉中膜平滑肌细胞表面葡萄糖转运体-1(GLUT-1)高表达部位,有氧糖酵解作用增强,18 氟脱氧葡萄糖(¹⁸F-FDG)摄取增加^[4],这可能是引起细胞线粒体膜电势超极化,造成细胞凋亡抵抗、增殖过度的原因。因此,本实验通过采用葡萄糖基修饰的纳米载体包封西地那非,促进纳米载体与病变的肺血管靶向结合,并观察其对肺动脉高压大鼠肺动脉压力和肺血管损伤的治疗效果。

材料与方法

实验主要材料 葡萄糖基修饰的纳米载体、普通纳米载体由中国药科大学药学院提供。野百合碱,平滑肌肌动蛋白一抗,西地那非(0.2%浓度溶于生理盐水)。采用硫酸胺梯度主动载药法包封西地那非(西地那非的终浓度 2 mg/ml)。

实验分组与处理 42 只 SD 雄性大鼠,2 月龄,体重 200~220 g,南京大学附属鼓楼医院实验动物中心提供,随机分为六组:对照组(CON 组),模型组(MCT 组),西地那非治疗组(SIL 组),靶向纳米载体组(GL 组),普通纳米载体包封西地那非组(L-SIL 组),靶向纳米载体包封西地那非组(GL-SIL 组)。除 CON 组外,其他组于大鼠颈背部皮下注射

野百合碱 60 mg/kg^[5],治疗组分别于 4 周后次日经尾静脉注射西地那非 8 mg/kg 或纳米制剂(含西地那非剂量 8 mg/kg),每日 1 次,持续 2 周,CON 组与 MCT 组则给予等体积的生理盐水。

大鼠平均肺动脉压力测定 大鼠腹腔注射 2%戊巴比妥钠 50 mg/kg,麻醉后经口插入 16 号套管针,连接呼吸机,RR 60 次/分,仰卧位固定于鼠板。备皮后正中打开胸腔,剪开心包,24 号留置针穿刺右心室流出道并将外套管插入肺动脉主干,连接压力换能器,当显示器屏幕上出现肺动脉压力波形并稳定 1 min 后,记录此时的肺动脉压力值。

组织固定 将输液皮条连接留置针,用生理盐水冲洗肺血管中的红细胞并剪开左心耳,直至心肺组织变白,经肺动脉注射 5 ml 10%的氯化钾处死动物,再通过气管导管行 10%的多聚甲醛灌注,待肺组织均匀膨胀 5 min 后取下左右心室和右下肺组织固定。

肺血管形态学检测 肺组织石蜡包埋切片后行 HE 染色,电子显微镜下观察和拍摄肺小血管,每组 3 个标本,每个标本 5 条血管,用 Image-Pro Plus 6.0 软件测量光学显微镜 400 倍视野下肺小动脉(直径 50~150 μm)的中膜直径(内外弹力板之间的厚度 MT)和血管外弹力板之间的直径 ED,计算中膜厚度(WT)=(2MT÷ED)×100%^[5]。

心肌细胞面积测定 右心室 HE 染色后,每组选取 3 个标本,每个标本选择 20 个右心室心肌细胞,通过 OLYMPUS cellsens Dimension 软件圈出心肌细胞边界计算其面积^[6]。

免疫组化检测肺血管 α-SMA 的表达 每组 3 个石蜡标本切片烘烤后脱蜡,抗原修复,滴加 α-SMA 一抗(抗体稀释度为 1:500),4 ℃孵育过夜后,PBS 冲洗 3 次,每次 5 min。再滴加二抗(稀释度 1:5 000),37 ℃温箱孵育 30 min 后 PBS 再次冲洗三遍。DAB 显色剂显微镜下显色,苏木素复染,经无水乙醇脱水,晾干后中性树脂封片。显微镜 400 倍视野下观察 α-SMA 的表达结果,每个标本选取 5 条血管用 Image-Pro Plus 6.0 软件测量计算 α-SMA 表达,用平均灰度值表示。

活体荧光示踪观察纳米载体的组织分布 雄性 SD 大鼠随机分为 2 组,每组 6 只,皮下注射野百合碱 60 mg/kg 4 周后,经尾静脉分别注射 IR-783 标记的普通(L-SIL 组)或者葡萄糖基修饰纳米载体(GL-SIL 组)。静脉注射 4 h 后处死动物,提取心脏、肝脏、脾脏、肺、肾组织,用 Caliper IVIS Spectrum 型生物发光荧光小动物活体成像系统检测并计算每只大鼠肺组织中荧光标记物的平均放射量^[7]。

统计分析 采用 SPSS 17.0 软件处理。正态分布计量资料以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组间比较用单因素方差分析。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

与 CON 组比较,MCT 组、GL 组、SIL 组和 L-SIL 组 mPAP 明显升高($P < 0.05$)。与 MCT 组比较,GL-SIL 组 mPAP 明显降低($P < 0.05$) (表 1)。

与 CON 组比较,MCT 组、SIL 组、GL 组和 L-SIL 组 WT 明显增加($P < 0.05$), α -SMA 表达明显增高($P < 0.05$)。与 MCT 组比较,GL-SIL 组 WT 和 α -SMA 的表达明显降低($P < 0.05$) (表 1,图 1—2)。

与 CON 组比较,MCT 组、SIL 组、GL 组和 L-SIL 组心肌细胞面积明显增大($P < 0.05$)。但 GL-SIL 组明显小于 MCT 组($P < 0.05$) (表 1)。

经尾静脉注射 IR-783 标记葡萄糖基修饰纳米载体 4 h 后,肺组织中平均荧光放射量 GL-SIL 组明显高于 L-SIL 组($P < 0.05$) (图 3)。

讨 论

野百合碱皮下注射可引起大鼠肺动脉高压,表现为肺血管平滑肌细胞增殖、内皮功能障碍、肺血管周围炎症细胞浸润,右心室肥厚,能很好地模拟人类肺动脉高压的病理改变^[8]。本实验结果显示,模型组大鼠与对照组比较,肺动脉压力明显升高,伴有肺小血管中膜增厚、管腔严重狭窄,右心室代偿性肥大。靶向纳米载体包封西地那非可明显降低肺动脉高压大鼠的平均肺动脉压力,改善肺血管中膜增殖和右心室肥大。

有研究表明,肺血管平滑肌细胞的过度增殖与凋亡抵抗在 PAH 肺血管重构中起着至关重要的作用,抑制这些细胞增殖,促进其凋亡能明显抑制肺血管重构的进程^[9]。本研究中,模型组大鼠肺血管平滑肌细胞过度增殖导致中膜增厚,甚至管腔狭窄。目前临床上使用的磷酸二酯酶-5 抑制剂(西地那非),通过激活 cGMP-PKG 通路,既能扩张血管,还能抑制平滑肌细胞的增殖和肺血管周围炎症,在一定程度上缓解肺动脉压力,改善患者 6 min 步行距离,但是其并不能明显改善肺高压患者的 5 年生存率。如果进一步增加西地那非的药物浓度可能会造成严重血管扩张、鼻塞、视觉异常等不良反应^[10-11]。

研究发现,肺动脉高压与肿瘤在代谢方面有着很多的相似性,如线粒体功能障碍,糖酵解增加,HIF-1 α 的活化等。PAH 肺血管平滑肌细胞存在着与肿瘤细胞相似的“Warburg”效应,即肺血管细胞通过上调 GLUT-1 加速对葡萄糖的摄取,有氧糖酵解作用加强,导致线粒体膜电势超极化,抑制细胞凋亡^[12]。Zhao 等^[13] 的研究也证实肺高压患者行

表 1 六组大鼠 mPAP、WT、 α -SMA 和右心室心肌细胞面积的比较($\bar{x} \pm s$)

组别	只数	mPAP(mmHg)	WT(%)	α -SMA	右心室心肌细胞面积(μm^2)
CON 组	7	19.86±1.95	34.01±9.49	0.293±0.042	173.32±40.47
MCT 组	7	34.14±2.27 ^a	60.77±8.53 ^a	0.643±0.047 ^a	341.32±112.92 ^a
GL 组	7	32.20±3.70 ^a	60.24±9.80 ^a	0.631±0.048 ^a	321.63±63.37 ^a
SIL 组	7	29.60±9.40 ^a	60.62±14.70 ^a	0.592±0.069 ^a	339.92±75.64 ^a
L-SIL 组	7	30.83±5.27 ^a	58.36±9.81 ^a	0.496±0.034 ^{abc}	280.79±55.82 ^{abd}
GL-SIL 组	7	25.29±3.35 ^b	43.59±9.88 ^{bcd}	0.388±0.051 ^{bcd}	190.13±41.89 ^{bcd}

注:与 CON 组比较,^a $P < 0.05$;与 MCT 组比较,^b $P < 0.05$;与 GL 组比较,^c $P < 0.05$;与 SIL 组比较,^d $P < 0.05$;与 L-SIL 组比较,^e $P < 0.05$

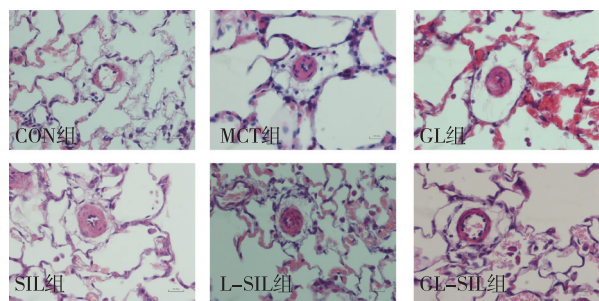


图 1 六组大鼠肺组织 HE 染色 (×400)

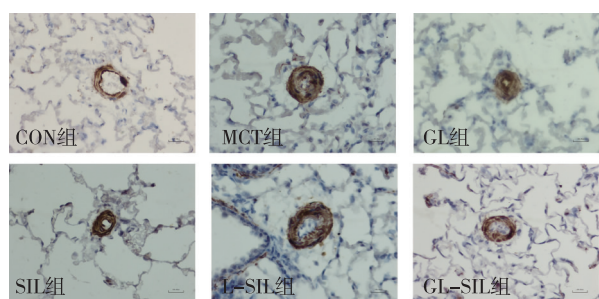
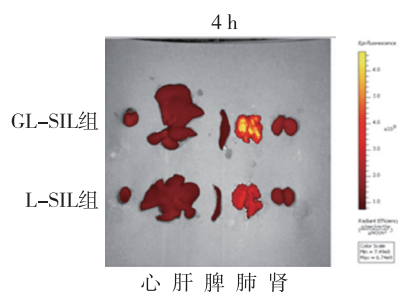
图 2 六组大鼠肺血管中膜 α -SMA 的表达 (×400)

图 3 L-SIL 组与 GL-SIL 组荧光标记物的比较

PET-CT 检查,¹⁸ FDG 在肺组织信号增强,与 GLUT-1 在肺组织表达上调,加速葡萄糖转运相关。同时 GLUT-1 在野百合碱肺高压大鼠肺血管损伤部位上调,PET-CT 检查发现¹⁸ FDG 在肺血管浓集。Xie 等^[14]研究发现带有葡萄糖基靶头的基因能被血脑屏障表面 GLUT-1 主动摄取,有利于药物向脑组织转运。因此,本研究采用普通纳米载体及葡萄糖基修饰纳米载体包封西地那非,并与单纯西地那非静脉注射比较对肺高压的疗效。本研究结果显示,与 L-SIL、SIL 组比较,GL-SIL 靶向结合肺组织明显增加,能明显降低大鼠肺动脉平均压力,抑制肺血管重构,改善右心室的代偿性肥大,这正是由于普通纳米颗粒在血液循环中极不稳定易被吞噬细胞所清除,且与靶部位的亲和力弱,使得靶组织的

药物浓度低,而主动靶向纳米载体弥补了这一缺陷,特异性结合靶组织,将纳米颗粒内化,有效地释放药物,从而发挥更高效专一的作用^[15-16]。此外,以往的实验都是通过西地那非灌胃的方式进行干预,而且药物的剂量(1~100 mg/kg)都有报道。本研究中,尾静脉注射西地那非并没有降低野百合碱大鼠的肺动脉压力和缓解血管重构,猜测可能与给药的途径以及不同公司药物的有效成分存在差异有关。

综上所述,靶向纳米载体包封西地那非可明显降低肺动脉压力,改善肺高压大鼠的肺血管中膜增厚,管腔狭窄和右心室心肌梗大。

参 考 文 献

- [1] Voelkel NF, Gomez-Arroyo J, Abbate A, et al. Pathobiology of pulmonary arterial hypertension and right ventricular failure. *Eur Respir J*, 2012, 40(6): 1555-1565.
- [2] Fox BD, Shimony A, Langleben D. Meta-analysis of monotherapy versus combination therapy for pulmonary arterial hypertension. *Am J Cardiol*, 2011, 108(8): 1177-1182.
- [3] Arias JL, Clares B, Morales ME, et al. Lipid-based drug delivery systems for cancer treatment. *Curr Drug Targets*, 2011, 12(8): 1151-1165.
- [4] Marsboom G, Wietholt C, Haney CR, et al. Lung¹⁸F-fluorodeoxyglucose positron emission tomography for diagnosis and monitoring of pulmonary arterial hypertension. *Am J Respir Crit Care Med*, 2012, 185(6): 670-679.
- [5] Li B, Yan J, Shen Y, et al. Dichloroacetate prevents but not reverses the formation of neointimal lesions in a rat model of severe pulmonary arterial hypertension. *Mol Med Rep*, 2014, 10(4): 2144-2152.
- [6] Zhang Q, Yao F, Raizada MK, et al. Apelin gene transfer into the rostral ventrolateral medulla induces chronic blood pressure elevation in normotensive rats. *Circ Res*, 2009, 104(12): 1421-1428.
- [7] Zhang S. Ex Vivo imaging, biodistribution, and histological study in addition to in vivo imaging. *Methods Mol Biol*, 2016, 1444: 183-191.
- [8] Gomez-Arroyo JG, Farkas L, Alhussaini AA, et al. The monocrotaline model of pulmonary hypertension in perspective. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2012, 302(4): L363-L369.
- [9] Huetsch JC, Jiang H, Larrain C, et al. The Na⁺/H⁺ exchanger contributes to increased smooth muscle proliferation and migration in a rat model of pulmonary arterial hypertension. *Physiol Rep*, 2016, 4(5): e12729.
- [10] Tantini B, Manes A, Fiumana E, et al. Antiproliferative effect of sildenafil on human pulmonary artery smooth muscle cells. *Basic Res Cardiol*, 2005, 100(2): 131-138.
- [11] Rubin LJ, Badesch DB, Fleming TR, et al. Long-term treat-

- ment with sildenafil citrate in pulmonary arterial hypertension: the SUPER-2 study. *Chest*, 2011, 140(5): 1274-1283.
- [12] Sutendra G, Michelakis ED. The metabolic basis of pulmonary arterial hypertension. *Cell Metab*, 2014, 19(4): 558-573.
- [13] Zhao L, Ashek A, Wang L, et al. Heterogeneity in lung¹⁸ FDG uptake in pulmonary arterial hypertension: potential of dynamic¹⁸ FDG positron emission tomography with kinetic analysis as a bridging biomarker for pulmonary vascular remodeling targeted treatments. *Circulation*, 2013, 128(11): 1214-1224.
- [14] Xie F, Yao N, Qin Y, et al. Investigation of glucose-modified liposomes using polyethylene glycols with different chain lengths as the linkers for brain targeting. *Int J Nanomedicine*, 2012, 7: 163-175.
- [15] Yingchoncharoen P, Kalinowski DS, Richardson DR. Lipid-based drug delivery systems in cancer therapy: what is available and what is yet to come. *Pharmacol Rev*, 2016, 68(3): 701-787.
- [16] 杨莉, 成丽, 魏于全. 脂质体在肿瘤靶向治疗中的应用. *华西医学*, 2005, 20(2): 387-388.

(收稿日期: 2017-12-09)

· 消息 ·

本刊再次入编北大图书馆《中文核心期刊要目总览》(2017 年版)

依据文献计量学的原理和方法,经研究人员对相关文献的检索、统计和分析,以及学科专家评审,《临床麻醉学杂志》入编《中文核心期刊要目总览》2017 年版(即第 8 版)之“外科学”类的核心期刊。这是本刊继 2008 年入编第 5 版后,连续第 4 次入编《中文核心期刊要目总览》,即“中文核心期刊”。

本次核心期刊的评价仍采用定量评价和定性评价相结合的方法。定量评价指标体系采用了被摘量(全文、摘要)、被摘率(全文、摘要)、被引量、他引量(期刊、博士论文、会议)、影响因子、他引影响因子、5 年影响因子、5 年他引影响因子、特征因子、论文影响分值、论文被引指数、互引指数、获奖或被重要检索工具收录、基金论文比(国家级、省部级)、Web 下载量、Web 下载率 16 个评价指标,选作评价指标统计源的数据库及文摘刊物达 49 种,统计到的文献数量共计 93 亿余篇次,涉及期刊 13 953 种。参加核心期刊评审的学科专家近 8 千位。经过定量筛选和专家定性评审,从我国正在出版的中文期刊中评选出 1 981 种核心期刊。

目前,本刊被国内主要的 3 个数据库收录,包括中国科技论文统计源期刊(中国科技核心期刊),中国科学引文数据库(CSCD)来源期刊以及《中文核心期刊要目总览》(中文核心期刊)入编期刊。