

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2017.31.011

乳铁蛋白修饰纳米粒包载的 α -倒捻子素对 AD 模型动物脑内特征性病理改变的影响 *

侯丽娜 谭小芳 倪雯雯 邱瑜 李娟[△]

(上海交通大学医学院药理学教研室 上海 200025)

摘要 目的:采用乳铁蛋白修饰的 PEG-PLA 纳米粒为递药工具包载 α -M,探讨其对快速老化 SAMP8 小鼠 AD 相关脑内病理特征的改善作用。**方法:**用乳化/溶剂蒸发法制备载 α -M 的 PEG-PLA 纳米粒 NP(α -M),将巯基化的乳铁蛋白连接于纳米粒表面,得到 Lf-NP(α -M)。7 月龄 SAMP8 系小鼠尾静脉给予注射生理盐水、Lf-NP(α -M)或空白纳米粒溶液,每日一次,连续两周。正常老化小鼠 SAMR 为模型对照组,通过对脑组织进行免疫组化分析,观察 Lf-NP(α -M)对 SAMP8 小鼠脑内炎症、A β 沉积等 AD 特征性病理变化的影响。**结果:**0.5、2 mg/kg α -M 对 SAMP8 小鼠脑内小胶质细胞激活、星形胶质细胞增生以及 A β 沉积均无显著影响;0.5 mg/kg Lf-NP(α -M)可抑制小胶质细胞的激活($P<0.001$),2 mg/mL Lf-NP(α -M)显著抑制星形胶质细胞增生以及 A β 沉积($P<0.05$)。**结论:**乳铁蛋白修饰的包载 α -M 的可降解纳米粒脑靶向递药系统成功有效,显著提高 α -M 的成药性并改善 AD 模型小鼠脑内特征性病理改变。

关键词:阿尔茨海默病; α -倒捻子素;纳米粒;乳铁蛋白;疾病修饰

中图分类号:R-33;R741.02;R749.16 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2017)31-6046-07

Effect of Lactoferrin Modified α -M Loaded Nanoparticle on the Pathological Changes in the Brain of an AD Animal Model*

HOU Li-na, TAN Xiao-fang, NI Wen-wen, QIU Yu, LI Juan[△]

(Department of Pharmacology, School of Medicine, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai, 200025, China)

ABSTRACT Objective: Lactoferrin was covalently conjugated to the α -M-loaded nanoparticles to receive Lf-NP(α -M), the disease modification effects of Lf-NP (α -M) in AD model mice was studied. **Methods:** α -M was loaded by poly (ethylene glycol)-poly(l-lactide) nanoparticles using emulsion/solvent evaporation method, and lactoferrin was covalently conjugated to it to form Lf-NP(α -M). We adopt the normal aging mice SAMR as negative control to SAMP8 mice. Saline and blank nanoparticles or Lf-NP (α -M) were injected to SAMP8 mice once a day for two weeks through the tail vein. The A β deposition and neuroinflammatory responses in animal brain were assessed after that, to evaluated its disease modification effects in AD. **Results:** α -M alone at 0.5 and 2 mg/kg could not significantly inhibit the activation of microglia, the proliferation of astrocyte and the deposition of A β in the brain of SAMP8 mice. Lf-NP (α -M) could significantly attenuate the activation of the microglia 0.5 mg/kg ($P<0.001$), and the inhibiting effects of the proliferation of astrocyte and the deposition of A β were significant at 2 mg/kg. **Conclusions:** Lf-NP (α -M) was a successful biodegradable and brain targeting drug delivering system, it could elevate the druggability of α -M, Lf-NP(α -M) could significantly improve the characterized pathological changes of AD in the brain of SAMP8 mice.

Key words: Alzheimer's disease; α -mangostin; Nanoparticle; Lactoferrin; Disease modification

Chinese Library Classification(CLC): R-33; R741.02; R749.16 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2017)31-6046-07

前言

研究表明多酚类化合物对多种以 β 淀粉样蛋白(Amyloid- β , A β)过度沉积为主要病理特征的动物模型显示出神经保护作用^[1-10]。本课题组前期研究证实多酚类小分子化合物 α -倒捻子素(α -mangostin, α -M)能高效抑制 A β 自身聚集,减少 A β

寡聚体和纤维的形成,并能抑制 A β 寡聚体毒性^[11]。但 α -M 口服给药生物利用度极低^[12],且不易透过血脑屏障,因而限制了其临床应用前景^[13]。

纳米粒靶向和载药系统因可特异性提高药物在靶位的浓度成为近年来药剂学研究的热点^[14-17]。纳米递药策略典型递送方案为将药物包载于纳米制剂的内部,并对纳米制剂表面进行

* 基金项目:国家自然科学基金项目(81503044;81373417);上海市卫生局青年基金项目(20134Y174)

作者简介:侯丽娜(1978-),女,博士,实验师,主要研究方向:阿尔茨海默病病理生理机制与靶标药物研究,

电话:021-63846590 转 776945, E-mail: linahou@shsmu.edu.cn

[△] 通讯作者:李娟(1968-),女,硕士生导师,副教授,主要研究方向:阿尔茨海默病病理生理机制与靶标药物研究,

电话:021-63846590 转 778012, E-mail: lijuanpharm@163.com

(收稿日期:2017-06-29 接受日期:2017-07-17)

结构修饰以增强血脑屏障(Blood Brain Barrier, BBB)透过能力(Fig.2)。乳铁蛋白(Lactoferrin, Lf)是一种存在于哺乳动物体内的阳离子糖蛋白,已有研究证实 Lf 可以通过受体介导的胞吞转运入脑^[18]。因此,本研究采用了 Lf 修饰的生物相容性纳米材料聚乙二醇聚乳酸 (poly (ethylene glycol) - poly (l-lactide), PEG-PLA)为递药工具,将 α -M 包载于纳米粒内部,形成 Lf-NP (α -M),以期提高脑内 α -M 的药物浓度和药理作用;并应用快速老化型小鼠 (Senescence Accelerated Mouse P8, SAMP8)模型,在以正常老化型小鼠 (Senescence-Accelerated Mouse-Resistant, SAMR) 为对照证明模型有效的情况下,观察到 Lf-NP (α -M)可减少模型小鼠脑内海马组织中 A β 斑块的沉积,小胶质细胞的激活和星形胶质细胞的增生,且上述作用强于 α -M。本研究结果为以 α -M 为候选药物的后续研究提供了实验基础。

1 材料与方法

1.1 实验材料与仪器

α -M(上海尚谊化工科技有限公司)用 DMSO 溶解成 5 mM 储备液, -80℃ 储存。6E10 antibody (Covance 公司); GFAP antibody (Millipore 公司); CD45 antibody (Serotec 公司); 羊抗鼠 / 兔 IgG 抗体 -HRP (北京中杉生物技术有限公司); MPEG, SUN-BRIGHT TMMEH-30H (NOF, 日本); Maleimide-PEG (NEKTAR, 美国); d,l-LA, 荷兰。辛酸亚锡, 二氯甲烷, 乙醚, 乙酸乙酯(上海化学试剂有限公司); 胆酸钠(中国医药集团上海化学试剂公司); 2-iminothiolane hydrochloride (2-IT) (Sigma, 美国); N-2- 羟乙基哌嗪 -N'-2- 乙磺酸 (HEPES) (上海加虹科技有限公司); Sepharose CL-4B (Pharmacia, 瑞典); 四硼酸钠, $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$

(中国医药集团上海化学试剂公司)。二氧化碳培养箱 (THERMO, 美国); 自动切片机 (LEITZ, 德国); 生物安全柜 (NUAIRE, 美国); 显微镜 (LEICA, 德国); 超声波细胞粉碎机 (JY92-II, 宁波新芝生物科技股份有限公司); 循环水式多用真空泵 (SHB-III, 郑州长城仪器厂); 旋转蒸发器 (R-200, Buchi, 德国); 恒温水浴 (B-490, Buchi, 德国); 脱盐柱, HiTrapTM Desalting (Amersham Pharmacia Biotech AB, 瑞典); 层析柱 (上海锦华层析设备厂); 核磁共振仪 (Mercury Plus 400 MHz, Varian, 美国); 粒度 / zeta 电位测定仪 (NICOMPTM 380 ZLS, NICOMP, 美国)。BCA 蛋白测试试剂盒 (Pierce, 美国)。快速老化模型 SAMP8 和抗快速老化模型 SAMR 小鼠, 7 月龄, 清洁级, 购自天津中医药大学第一附属医院 (动物质量合格证号: W-J 津实动质 M 准字第 006 号), 饲养于屏蔽环境中。

1.2 实验方法及步骤

1.2.1 制备共聚物 MPEG-PLA 和 Mal-PEG-PLA 采用开环聚合法分别合成甲氧基聚乙二醇-聚乳酸 (MPEG-PLA) 和马来酰亚胺聚乙二醇-聚乳酸 (Maleimide-PEG-PLA) (Fig 1): 将纯化的 d,l-LA 与 MPEG (或 Maleimide-PEG) 按比例装入干燥的反应瓶中, 加入适量 10% 辛酸亚锡甲苯溶液, 密封后在 70℃ 抽真空 2 h, 除去甲苯及氧气, 然后在 160℃ 下反应 4 h。反应结束后, 冷却到室温, 加入二氯甲烷溶解, 再用过量的乙醚-石油醚混合溶液沉淀, 除去未反应的 d,l-LA, 洗涤沉淀物, 待溶剂挥发干净后用丙酮溶解, 再用过量甲醇沉淀, 进一步除去未反应的 MPEG 和 d,l-LA。纯化后聚合物放在 40℃ 真空干燥箱中干燥 24 h, 真空干燥器中保存^[19]。将共聚物溶于 CDCl_3 中, 进行 ¹H 核磁共振 (NMR) 分析。并根据谱图中 5.20 ppm 和 3.65 ppm 峰面积计算数均分子量。

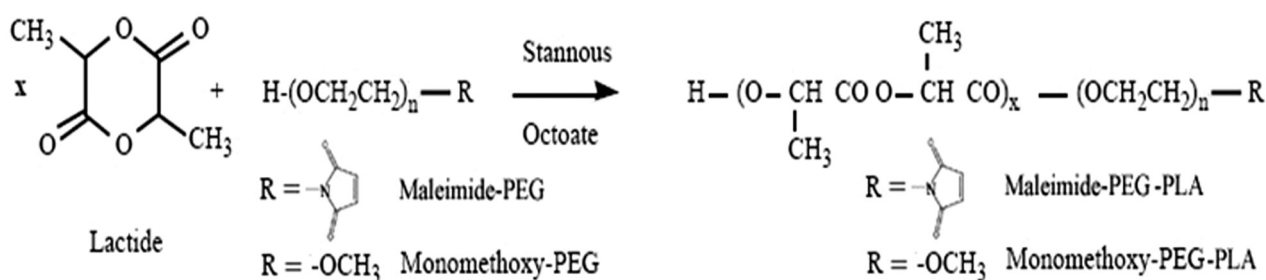


图 1 共聚物 MPEG-PLA 和 Maleimide-PEG-PLA

Fig.1 Reaction scheme for the synthesis of Maleimide-PEG-PLA and MPEG-PLA

1.2.2 纳米粒包载 α -M 将甲氧基聚乙二醇-聚乳酸 (MPEG-PLA) 和马来酰亚胺聚乙二醇-聚乳酸 (Maleimide-PEG-PLA) 按比例混合, 采用复乳 / 溶媒蒸发法制备 NP。精确称取 MPEG3000-PLA 9 mg, Mal-PEG3000-PLA 1 mg, 放入 5 mL EP 管, 按顺序加入二氯甲烷 0.5 mL, 1 mg/mL α -M 0.5 mL, 1% 胆酸钠 (CS) 2 mL, 200 w 冰浴超声 2 min, 每秒超声一次, 每次超声一秒。制备好的纳米粒倒入 20 mL 0.5% CS 搅拌 5 min, 然后旋转蒸发至无气泡产生, 12500 rpm 离心 45 min。沉淀加入 1 mL HEPES 溶液, 吹打均匀^[20]。

1.2.3 Lf 巯基化 采用 Traut's 试剂巯基化乳铁蛋白 (Lactoferrin, Lf) (Fig 2)。乳铁蛋白与巯基化试剂反应比例的不同, 导致最终蛋白连接巯基的个数的不同, 当乳铁蛋白与巯基化试剂的摩

尔比为 1:40 时, 乳铁蛋白上最终连接的巯基数目最多 (1 到 1.5 个之间)。因此, 巯基化反应时乳铁蛋白与巯基化试剂的摩尔比选定为 1:40。精密称取 1 mg Lf, 溶解于 0.15 mol/L 的硼酸钠溶液 (pH 8.5) 中, 加入 40 倍摩尔比 Traut's 试剂, 室温低速搅拌 1 h, 过 HiTrap 脱盐柱, 以洗脱液 A 洗脱除去小分子杂质, 收集蛋白组分, 用 BCA 蛋白检测试剂盒测定 Lf 浓度^[21]。

1.2.4 Lf 修饰纳米粒 Mal-PEG-PLA 通过表面的马来酰亚胺基与巯基化 Lf 共价连接得到 Lf 修饰纳米粒。Mal 与巯基反应比例为 3:1, 根据分子量和 Lf 浓度计算所需巯基化 Lf 溶液的量。将制备好的 α -M-NPPLA 或 NPPLA 与计算量的巯基化 Lf 溶液混合置于 2 mL 小烧杯中, 磁力搅拌 8 h。将反应好的溶液转移至 1.5 mL EP 管中, 12000 rpm 离心 45 min, 沉淀复融于约

1 mL HEPES 溶液中,吹打均匀,制成 α -M-Lf-NPPLA, 4℃ 保存 (Fig.3)。 α -M 精密称取 α -M, 用甲醇稀释成 0.5 μ g/mL, 1 μ g/mL, 5 μ g/mL, 10 μ g/mL, 50 μ g/mL 系列标准溶液。色谱条件: 色谱柱, YMC (5 μ m, 150 mm $\times$ 4.6 mm); 检测器, SHIMADZU 3PD20A 紫外检测器; 流动相, 甲醇: 水 (94:6); 流速, 1.0 mL/min; 检测波长, 320 nm; 柱温, 25 $^{\circ}$ C。分别取 α -M 20 μ L 进样分析, HPLC 350 nmUV 测量峰面积, 每一浓度测定三次, 取平均值。进行线性回归, 求得浓度 (C, mg/mL)- 峰面积标准曲线。取 1 μ L α -M-Lf-NPPLA, 用甲醇稀释 100 倍, HPLC 测定 α -M 350 nm 峰面积, 依标准曲线求得 α -M-Lf-NPPLA 中 α -M 的浓度 C。包封率 (Entrapping efficiency, EE) 和载药量 (Drug loading capacity, DLC) 计算公式: 载药量 (Drug Loading Capacity, DLC): $DLC\% = C \times N / N \times 100\%$; 包封率 (Encapsulation Efficiency, EE) $EE\% = C \times n \times V / W \times 100\%$ 。式中, M1 为总 α -M 投料量 (μ g), C 为纳米粒中 α -M 的浓度 (μ g/mL), n 为稀释倍数, V 为收集的 α -M-Lf-NPPLA 的体积 (mL), M 为 α -M-NP 的总重量 (mg)^[22]。

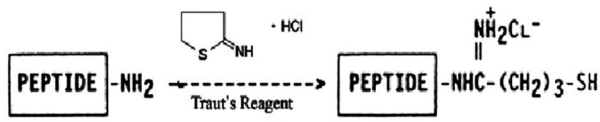


图2 乳铁蛋白(Lf)巯基化

Fig.2 Method for the introduction of thiol groups at primary peptide amino groups

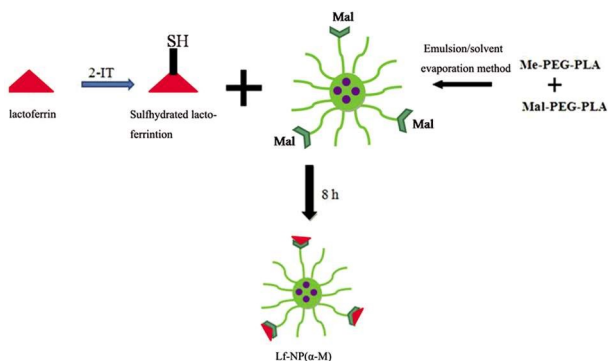


图3 乳铁蛋白修饰的载 α -M 纳米粒(Lf-NP(α -M))制备流程图

Fig.3 Flow Chart of preparation of Lf-NP(α -M)

1.2.5 粒径、Zeta 电位测定 用 Malvern 粒径 /Zeta 电位测定仪, 测定溶解于三蒸水中的纳米粒的光散射粒径和 Zeta 电位。

1.2.6 电镜观察 Lf-NP(α -M)形态 Lf-NP(α -M)的三蒸水溶液滴于电镜专用铜网上, 自然沉降 2 min, 2% (w/v) 的磷钨酸负染 1 min, 透射电镜观察 NP(α -M)的形态, 电压 80 kV, 25 kV, 放大倍数 20000 倍。

1.2.7 动物给药 α -M 用少量乙醇 /Tween80 溶液 (体积比为 1:1) 溶解后, 用生理盐水稀释成所需浓度^[12]。实验分组为: α -M 处理组 (0.5 mg/kg, 2 mg/kg), Lf-NP(α -M) 处理组 (0.5 mg/kg, 2 mg/kg), 溶剂组处理组为生理盐水和 not 包载 α -M 的空纳米粒 Lf-NPPLA, 给药途径为尾静脉注射, 每天 1 次, 连续给药两周。以 SAMR 鼠为阴性对照, 给予生理盐水, 尾静脉注射, 每天 1 次, 连续两周。

1.2.8 组织切片制备及免疫组化 每组 5 只小鼠, 苯巴比妥钠

(1%) 麻醉后, 将 12 号注射针头刺入左心室尖部, 剪开右心耳, 用 50 mL 3.7% 甲醛溶液灌流, 直至肝脏、四肢、尾变硬。断头, 取出完整的大脑, 3.7% 甲醛溶液固定, 浸蜡, 包埋, 切片, 厚度 10 μ m。避光保存。将石蜡切片脱蜡, 切片置于 0.01 M, pH6.0 的柠檬酸盐缓冲液内, 微波抗原修复 15 min, 室温冷却 20 min 后, 磷酸盐缓冲液 (PBS) 漂洗 3 次; 滴加 3% 过氧化氢室温下孵育 10 min 以阻断内源性过氧化物酶活性, PBS 漂洗 3 次; 滴加特异性一抗 6E10 (1:150), GFAP antibody (1:50), CD45 antibody (1:50); 一抗 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜, PBS 漂洗 3 次; 阴性对照以 PBS 代替一抗进行; 羊抗鼠 / 兔 IgG 抗体 -HRP 多聚体室温孵育 15 min, PBS 漂洗 3 次; DAB 显色, 苏木精复染, 常规梯度乙醇脱水, 中性树胶封片。于 400 倍光镜下每张切片随机选取 3 个视野摄片, 图像经 IMS 细胞图象分析系统对免疫组化阳性信号进行积分光密度 (optical density, OD) 值测定。

1.3 统计学分析

所得数据均用 means $\pm$ SEM 表示, 使用 GraphPad Prism 4.0 统计学软件进行统计学分析, 组间比较采用 ANOVA, 组间两两比较采用 Dunnet 检验, 以 $P < 0.05$ 为差别有统计学意义。

2 结果

2.1 Lf-NP(α -M)的制备

用 HPLC 法以 α -M 浓度和峰面积直线回归得标准曲线如图 4 所示, $r^2 = 0.99995$, 线性良好。

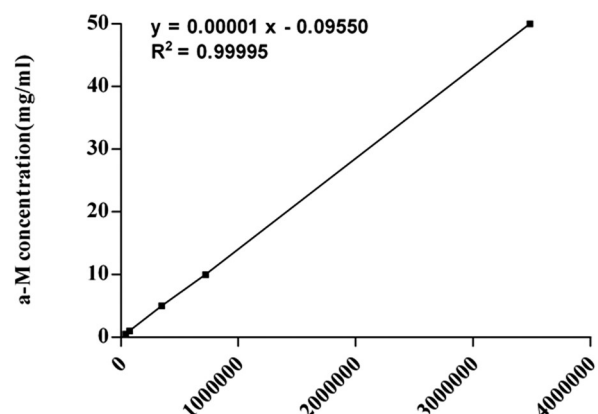


图4 HPLC 检测 α -M 浓度标准曲线

Fig.4 Concentration of α -M by HPLC

用开环聚合法分别合成的 MPEG-PLA 和 Maleimide-PEG-PLA, 与 α -M 一起, 采用复乳 / 溶剂蒸发法制备 α -M-NPPLA, 之后通过来酰亚胺基与 Lf 共价连接, 得到 Lf 修饰纳米粒 Lf-NP (α -M), 粒度 /zeta 电位测定仪测得粒径为 145.3 ± 59 nm。Lf-NP(α -M) 甲醇稀释 100 倍后以 HPLC 同样色谱条件测得 α -M 峰面积 (Fig 5), 带入回归方程算出其浓度为 345.048 μ g/mL。另外 α -M 的保留时间约为 47.5 min, 峰形良好, 且样品峰处无其它杂峰干扰, 表明分析方法具有良好的专属性。

依公式求得包封率 (Entrapping efficiency, EE) 和载药量 (Drug loading capacity, DLC) 分别为 69% 和 0.92%。电镜结果显示 Lf-NP(α -M), 外观圆整, 粒径较均一, 为 50-60nm, 分散性良好, 如图 6 所示。

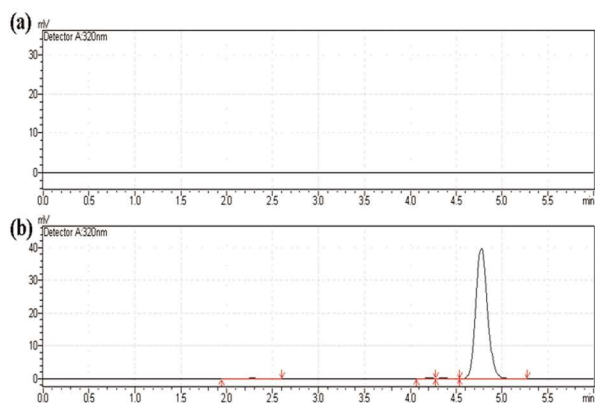
图5 Lf-NP(α -M)色谱图

Fig.5 HPLC chromatograms of α -M. (a) blank; (b) Lf-NP(α -M)

2.2 α -M 及 Lf-NP(α -M)对 SAMP8 鼠脑内小胶质细胞激活的影响

CD45 是小胶质细胞激活的特异性标志物。如图 7 所示,与对照组 SAMR 相比,模型组 SAMP8 给予赋形剂(NS)和空纳米粒(NP)后,小鼠皮层内 CD45 标记的小胶质细胞明显增多,光密度值明显升高 (分别为 $P<0.05$ 和 $P<0.001$), 说明 SAMP8 实验模型有效可行; α -M 给药 2 周后,仅 2 mg/kg 组可减弱小胶质细胞激活,但与赋形剂(NS)组相比光密度值无显著性差异;Lf-NP(α -M)给药 2 周,可浓度依赖性地减弱皮层小胶质细胞

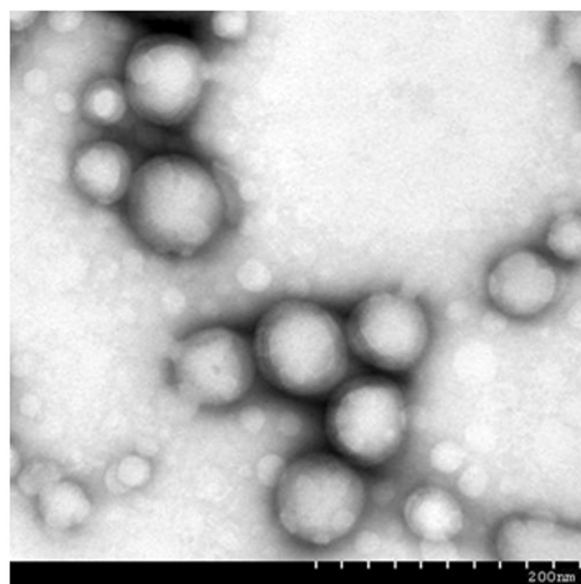
图6 Lf-NP(α -M)的透射电镜照片

Fig.6 Transmission electron microscopy images of Lf-NP(α -M)

胞激活,各剂量组与空纳米粒(NP)相比光密度值均有显著性差异($P<0.001$);且 Lf-NP(α -M)在 2 mg/kg 浓度时与 α -M 单独给药相比,可更显著地降低小胶质细胞的激活($P<0.05$)。

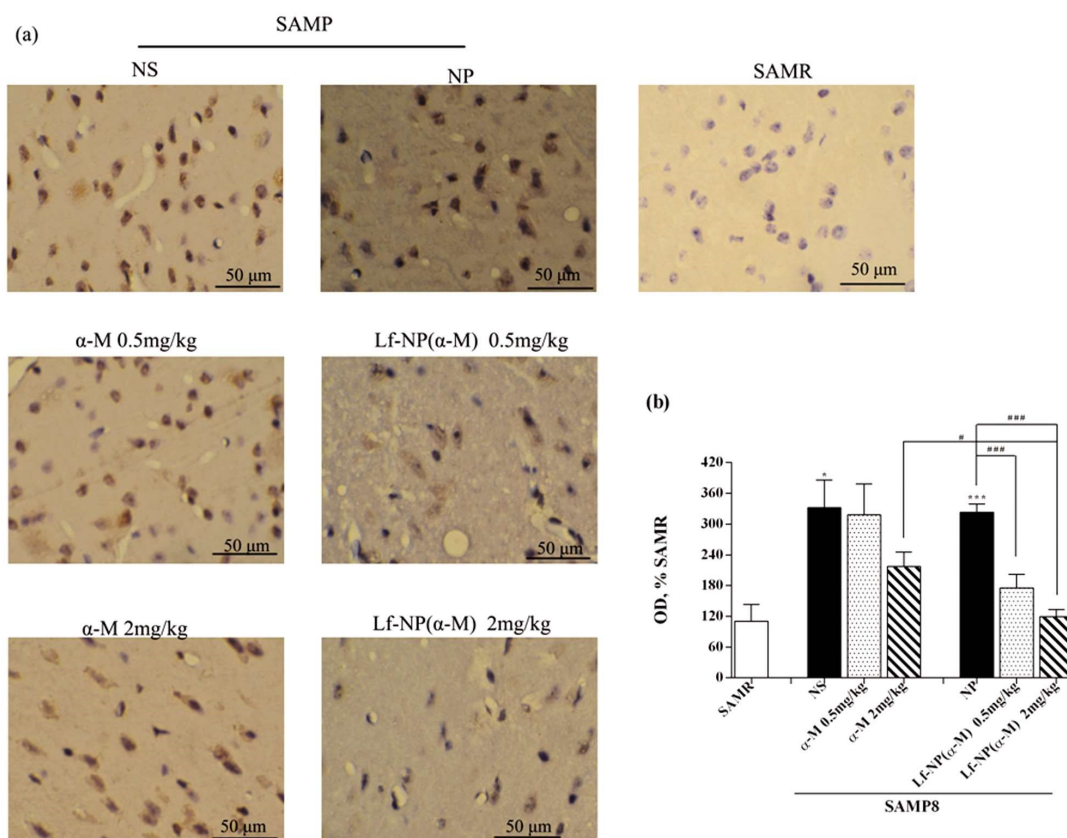
图7 α -M 及 Lf-NP(α -M)对 SAMP8 脑内 CD45 标记的小胶质细胞激活的影响

Fig. 7 Attenuation of neuroinflammatory responses in 7-month SAMP8 by α -M and Lf-NP(α -M). Cortical sections from SAMP8 were immunostained with an antibody against the microglial marker CD45. (a) Representative photographs of CD45-immunoreactivity cells in the cortex after different treatment. 7-month SAMR were used as a negative control. "NP" was the empty nanoparticles, and "NS" was normal saline (b) OD value of CD45-staining in the cortex. Results are expressed as percentage of the SAMR. Data represent as means $\pm$ SEM, $n=3$. Bar, 50 μ m. * $P<0.05$, *** $P<0.001$, significantly different versus the SAMR group. # $P<0.05$, ### $P<0.001$, significantly different. Magnification of photographs was 400 $\times$.

2.3 α -M 及 Lf-NP(α -M)对 SAMP8 鼠脑内星形胶质细胞增殖的影响

纤维酸性蛋白(Glial fibrillary acidic protein, GFAP)是星形胶质细胞的特异性标志物。星形胶质细胞和小胶质细胞同属于中枢神经系统的免疫细胞,在致炎因素作用下能被激活。适度激活具有神经元保护作用,而过量激活会通过分泌细胞因子、炎症因子、补体等方式损伤神经元和突触。如图 8 所示,与对照

组 SAMR 相比,7 月龄的模型组 SAMP8(经赋形剂(NS)或空纳米粒(NP)处理后,小鼠皮层内星形胶质细胞明显增生并成簇状围绕,光密度值显著升高(分别为 $P<0.05$ 和 $P<0.01$),说明 SAMP8 实验模型有效可行; α -M 两个剂量下均无显著抑制星形胶质细胞增殖的作用;Lf-NP(α -M)在 2 mg/kg 时能显著抑制星形胶质细胞的增殖($P<0.01$)。

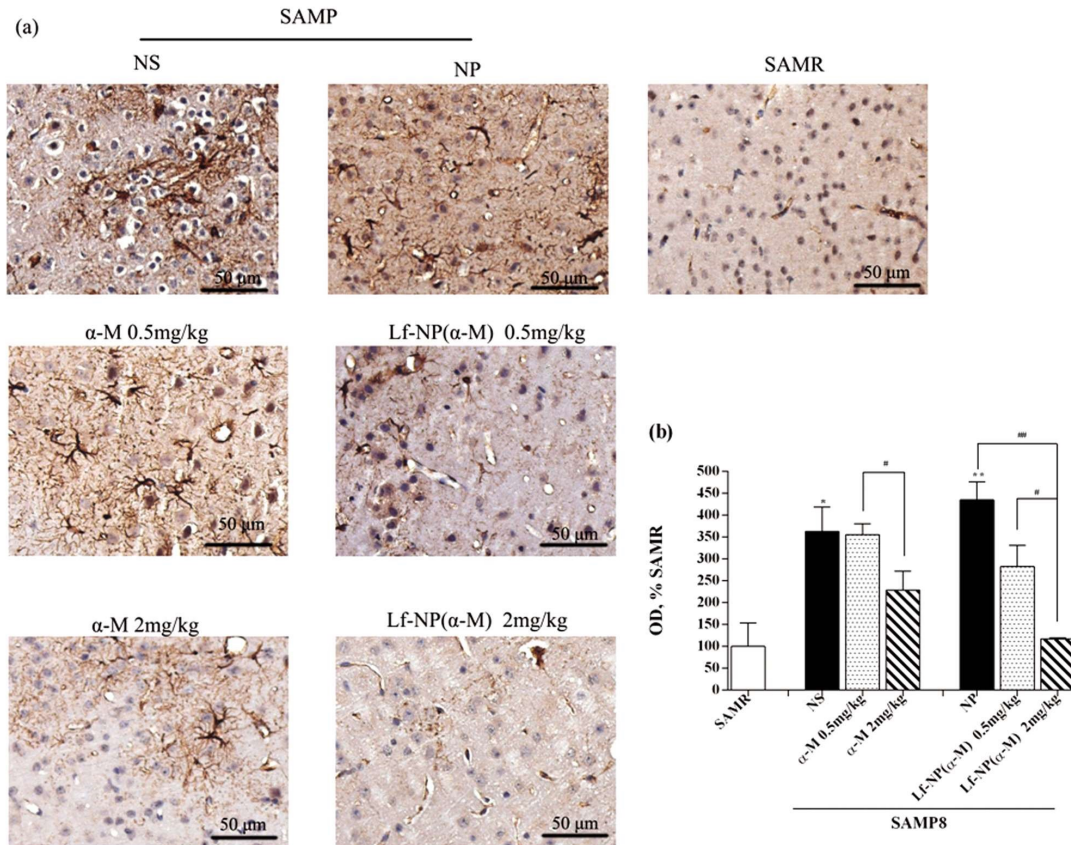


图 8 α -M 及 Lf-NP(α -M)对 SAMP8 脑内星形胶质细胞增殖的影响

Fig.8 The effect of α -M and Lf-NP(α -M) on astrocytosis in 7-month SAMP8

Cortical sections from SAMP8 were immunostained with anti-GFAP antibody, a marker of astrogliosis. (a) Representative photographs of GFAP-immunoreactivity cells in the cortex after different treatment. 7-month SAMR were used as a negative control. "NP" was the empty nanoparticles, and "NS" was normal saline. (b) OD value of GFAP-staining in the cortex. Results are expressed as percentage of the SAMR. Data represent as means $\pm$ SEM, $n=3$. Bar, 50 μ m. * $P<0.05$, ** $P<0.01$, significantly different versus the SAMR group. # $P<0.05$, ### $P<0.001$, significantly different. Magnification of photographs was 400 $\times$.

2.4 α -M 及 Lf-NP(α -M)对 SAMP8 鼠脑内 $A\beta$ 沉积的影响

6E10 能够特异性的识别 $A\beta$ (1-16)片段,是常用的高选择性的 $A\beta$ 抗体。如图 9 所示,与对照组 SAMR 相比,7 月龄的模型组 SAMP8(经赋形剂(NS)或空纳米粒(NP)处理后,小鼠海马内 6E10 标记的 $A\beta$ 显著增多(分别为 $P<0.05$ 和 $P<0.0001$),说明 SAMP8 实验模型有效可行。空纳米粒脑靶向递药后由于纳米粒的刺激,会引起微弱的无菌性炎症反应(如激活星形胶质或小胶质细胞),而适度的炎症反应可以帮助脑内 $A\beta$ 的清除,因此可以解释空纳米粒(NP)组 $A\beta$ 比赋形剂(NS)组略下降但无统计学差异的现象;给药 2 周后, Lf-NP(α -M) 2 mg/kg 组可显著皮层中的 $A\beta$ 沉积($P<0.05$);且 Lf-NP(α -M)在 0.5 mg/kg 和 2 mg/kg 浓度下与 α -M 相比,均可更显著的降低 $A\beta$ 的沉积(分别为 $P<0.01$ 和 $P<0.05$)。

3 讨论

α -M 是从山竹子果壳中分离的由带酮核的多酚形成的黄色结晶,有很多药理学作用,如抗炎、抗菌、抗凋亡、抗组胺 H1 受体、抗氧化等,还可在多种肿瘤细胞中通过下调肿瘤转移相关基因的表达,发挥抑制肿瘤细胞转移的作用^[23-26]。然而,由于首关消除效应非常明显, α -M 口服给药生物利用度极低,且 α -M 溶解性差,其分子结构特点也导致其不易透过 BBB,这些一直都是国内外在整体水平研究 α -M 药理学作用的障碍。近年来利用以非侵袭性给药途径提高药物脑内递送的研究,因其能够克服外科手术所带来的创伤和危险,已成为国内外脑内靶向给药的研究热点^[14-16]。

本研究中应用的乳铁蛋白修饰聚乳酸纳米粒载药系统

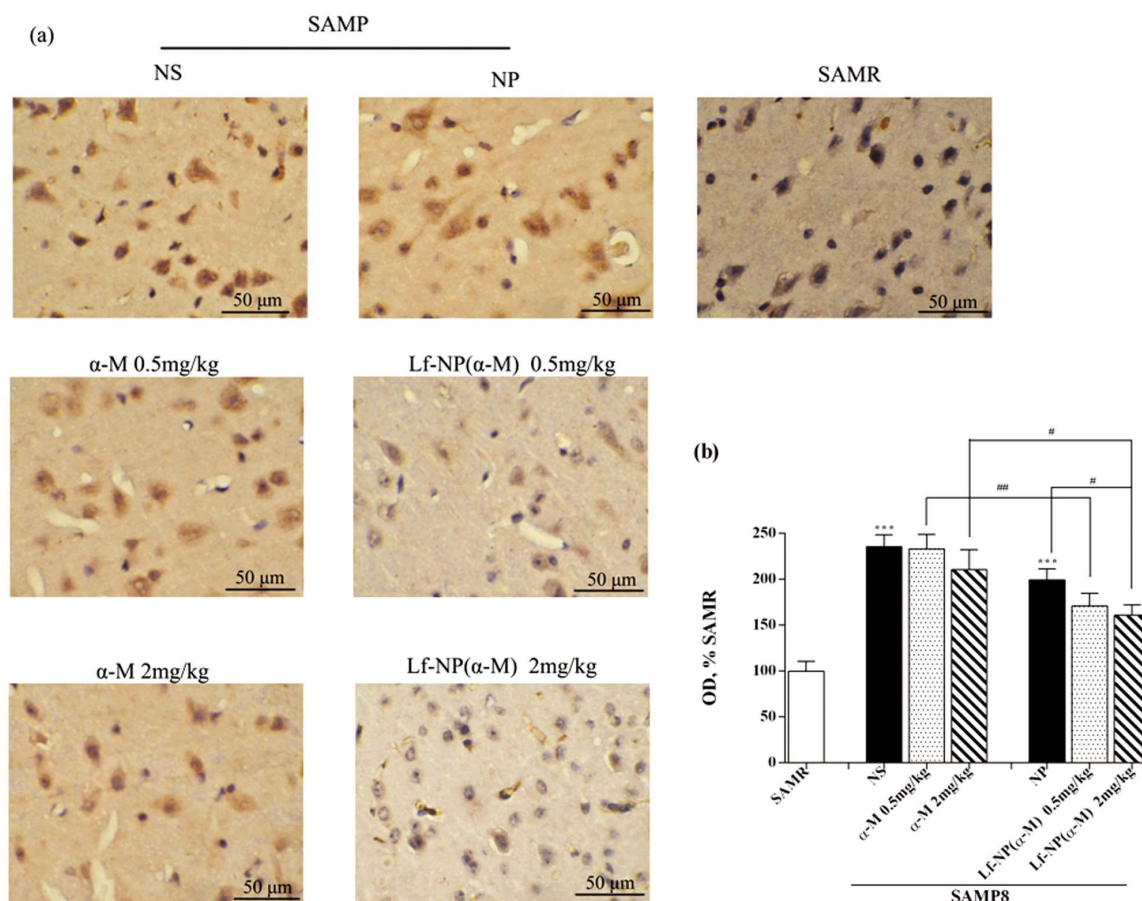


图9 α -M 及 Lf-NP(α -M)对 SAMP8 脑内 $A\beta$ 沉积的影响

Fig. 9 α -M and Lf-NP(α -M) can reduce $A\beta$ deposition on the 7-month SAMP8 hippocampus. Hippocampus was immunostained with 6E10, which was an antibody specifically for $A\beta$. (a) Representative photographs of 6E10-immunoreactivity cells in the hippocampus after different treatment. 7-month SAMR were used as negative control. "NP" was the empty nanoparticles, and "NS" was normal saline. (b) OD value of 6E10-staining in the hippocampus. Results are expressed as percentage of the SAMR. Data represent as mean $\pm$ SEM, $n=3$. Bar, 50 μ m. *** $P<0.001$, significantly different versus the SAMR group. # $P<0.05$, ## $P<0.01$, significantly different. Magnification of photographs was 400 $\times$.

(Lf-NP_{PLA})为生物可降解材料,可借助表面乳铁蛋白(Lf)以受体介导胞吞转运方式增加其脑内转运,不仅安全性好,还能显著提高药物的稳定性和输送能力。而 α -M 药代动力学研究表明 α -M 经静脉注射后能快速分布到组织,这一特点使得其非常适合使用纳米粒包载^[12]。Lf-NP(α -M)纳米粒采用复乳/溶媒蒸发法制备,经包载后的药物可以掩盖其自身的理化性质,代之以纳米粒的特性。而且纳米粒表面是经 PEG 修饰,可避免单核巨噬系统的吞噬,延长在血浆中的半衰期,提高血浆药时曲线下面积(Area under curve, AUC),具有长循环作用,所得纳米粒粒径均匀,包封率和载药量较高。

SAM 是由日本京都大学竹田俊男教授等开发的系列快速老化动物模型,分为快速老化的 P 系列(Senile-Prone)和正常老化的 R 系列(Senile-Resistant)。SAMP8 小鼠重要的特征属性是成长期(4~6 月龄)过后迅速出现与人类极为相似的老化特征,学习和记忆能力呈增龄性加速衰退。SAMP8 鼠是目前公认的理想衰老型痴呆模型,已广泛用于 AD 治疗药物的药效学研究^[27,28]。本研究选用 7 月龄的 SAMP8 系小鼠为研究对象,与正常老化小鼠 SAMR(模型对照)相比,SAMP8 在给予赋形剂(NS)和空纳米粒(NP)后,脑内炎症(脑内炎症观察指标包括小胶质细胞的激活和星形胶质细胞的增生)和 $A\beta$ 的沉积这些 AD 特

征性病理变化的影响均显著升高,说明实验模型有效可行。 α -M 在两个给药剂量(0.5 mg/kg 和 2 mg/kg)下对 SAMP8 模型动物脑内小胶质细胞的激活、星形胶质细胞增生以及 $A\beta$ 的沉积均无显著抑制作用;而 Lf-NP(α -M)则可在较低的给药剂量(0.5 mg/kg)时即对上述病理变化起抑制效应,该效应在 2 mg/kg 时最为显著。

总之,本研究结果表明包载 α -M 的可降解纳米粒脑靶向递药系统的成功有效,克服了多酚类药物在体内不稳定、血药浓度低及靶器官药物浓度低等问题,而且所使用的材料无毒可降解均为美国 FDA 所认可,显著改善了 α -M 成药性。本研究结果从整体水平证明了 α -M 的 AD 治疗价值,为后续以 α -M 为先导化合物开发 AD 治疗新药提供了实验基础。

参考文献(References)

- [1] Noratiqah SB, Naina-Mohamed I, Zulfarina MS, et al. Natural Polyphenols in the Treatment of Alzheimer's Disease [J]. Curr Drug Targets, 2017, 28
- [2] Hu J, Lin T, Xu J, et al. Polyphenols isolated from leaves of Vitis thunbergii var. taiwaniana regulate APP related pathway [J]. Bioorg Med Chem Lett, 2016, 26(2): 505-511
- [3] Tomobe K, Fujii H, Sun B, et al. Modulation of infection-induced in-

- flammation and locomotive deficit and longevity in senescence-accelerated mice-prone (SAMP8) model by the oligomerized polyphenol Oligonol[J]. Biomed Pharmacother, 2007, 61(7): 427-434
- [4] Spagnuolo C, Napolitano M, Tedesco I, et al. Neuroprotective Role of Natural Polyphenols[J]. Curr Top Med Chem, 2016, 16(17): 1943-1950
- [5] Gasca CA, Castillo WO, Takahashi CS, et al. Assessment of anticholinesterase activity and cytotoxicity of cagaita (*Eugenia dysenterica*) leaves[J]. Food Chem Toxicol, 2017, 24
- [6] Xicota L, Rodriguez-Morato J, Dierssen M, et al. Potential Role of (-)-Epigallocatechin-3-Gallate (EGCG) in the Secondary Prevention of Alzheimer Disease[J]. Curr Drug Targets, 2017, 18(2): 174-195
- [7] Hayden EY, Yamin G, Beroukhim S, et al. Inhibiting amyloid β -protein assembly: Size-activity relationships among grape seed-derived polyphenols[J]. J Neurochem, 2015, 135(2): 416-430
- [8] Guo H, Dong YQ, Ye BP. Cranberry extract supplementation exerts preventive effects through alleviating A β toxicity in *Caenorhabditis elegans* model of Alzheimer's disease [J]. Chin J Nat Med, 2016, 14(6): 427-433
- [9] Libro R, Giacoppo S, Soundara Rajan T, et al. Natural Phytochemicals in the Treatment and Prevention of Dementia: An Overview [J]. Molecules, 2016, 21(4): 518
- [10] Korshavn KJ, Jang M, Kwak YJ, et al. Reactivity of Metal-Free and Metal-Associated Amyloid- β with Glycosylated Polyphenols and Their Esterified Derivatives[J]. Sci Rep, 2015, 5: 17842
- [11] Wang Y, Xia Z, Xu JR, et al. A -mangostin, a polyphenolic xanthone derivative from mangosteen, attenuates β -amyloid oligomers-induced neurotoxicity by inhibiting amyloid aggregation[J]. Neuropharmacology, 2012, 62(2): 871-881
- [12] Li L, Brunner I, Han AR, et al. Pharmacokinetics of α -mangostin in rats after intravenous and oral application [J]. Mol Nutr Food Res, 2011, 55 Suppl 1: S67-74
- [13] Aisha AF, Ismail Z, Abu-Salah KM, et al. Solid dispersions of α -mangostin improve its aqueous solubility through self-assembly of nanomicelles[J]. J Pharm Sci, 2012, 101(2): 815-825
- [14] Kopp M, Kollenda S, Epple M. Nanoparticle-Protein Interactions: Therapeutic Approaches and Supramolecular Chemistry [J]. Acc Chem Res, 2017, 8
- [15] Wang L, Hu C, Shao L. The antimicrobial activity of nanoparticles: present situation and prospects for the future [J]. Int J Nanomedicine, 2017, 12: 1227-1249
- [16] Gref R, Lück M, Quellec P, et al. 'Stealth'corona-core nanoparticles surface modified by polyethylene glycol (PEG): influences of the corona (PEG chain length and surface density) and of the core composition on phagocytic uptake and plasma protein adsorption [J]. Colloids Surf B Biointerfaces, 2000, 18: 301-313
- [17] Lee JH, Choi JW. Application of Plasmonic Gold Nanoparticle for Drug Delivery System[J]. Curr Drug Targets, 2017, Apr 27
- [18] Brown M S, Goldstein J L. A receptor-mediated pathway for cholesterol homeostasis[J]. Science, 1986, 232(4746): 34-47
- [19] Zhang Y, Zhang QZ, Zha LS, et al. Preparation, characterization and application of pyrene-loaded methoxy poly (ethylene glycol)-poly (lactic acid) copolymer nanoparticles [J]. Colloid Polym Sci, 2004, 282: 1323-1328
- [20] Tobio M, Gref R, Sanchez A, et al. Stealth PLA-PEG nanoparticles as protein carriers for nasal administration [J]. Pharm Res, 1998, 15(2): 270-275
- [21] Huwyler J, Wu D, Pardridge WM. Brain drug delivery of small molecules using immunoliposomes [J]. Proc Natl Acad Sci, 1996, 93(24): 14164-14169
- [22] De Haan A, Tomee JF, Huchshorn JP, et al. Limmunoadjuvant system for stimulation of mucosal and systemic antibody responses against inactivated measles virus administered intranasally to mice [J]. Vaccine, 1995, 13(14): 1320-1324
- [23] Narasimhan S, Maheshwaran S, Abu-Yousef IA, et al. Anti-Bacterial and Anti-Fungal Activity of Xanthones Obtained via Semi-Synthetic Modification of α -Mangostin from *Garcinia mangostana* [J]. Molecules, 2017, 22 (2)
- [24] Aukkanimart R, Boonmars T, Sriraj P, et al. In Vitro and In Vivo Inhibitory Effects of α -Mangostin on Cholangiocarcinoma Cells and Allografts[J]. Asian Pac J Cancer Prev, 2017, 18(3): 707-713
- [25] Wang MH, Zhang KJ, Gu QL, et al. Pharmacology of mangostins and their derivatives: A comprehensive review [J]. Chin J Nat Med, 2017, 15(2): 81-93
- [26] Zhang KJ, Gu QL, Yang K, et al. Anticarcinogenic Effects of α -Mangostin: A Review[J]. Planta Med, 2017, 83(3-04): 188-202
- [27] Huang JL, Jing X, Tian X, et al. Neuroprotective Properties of Panax notoginseng Saponins via Preventing Oxidative Stress Injury in SAMP8 Mice[J]. Evid Based Complement Alternat Med, 2017, 2017: 8713561
- [28] Zhang ZX, Zhao RP, Wang DS, et al. Fuzhisan Ameliorates the Memory Deficits in Aged SAMP8 Mice via Decreasing A β Production and Tau Hyperphosphorylation of the Hippocampus [J]. Neurochem Res, 2016, 41(11): 3074-3082

(上接第 6098 页)

- [26] Maxwell C, Cherry A, Daneshmand M, et al. Assessment of Coronary Blood Flow by Transesophageal Echocardiography[J]. Journal of Cardiothoracic & Vascular Anesthesia, 2016, 30(1): 258-260
- [27] Marinakis S, Burki M, Abdelsayed S, et al. A model of anterograde oxygenated lung blood flow in a cardia[J]. Asaio Journal, 2016, 62(5): 631
- [28] Jiao H, Ding X, Liu Y, et al. Clinical experience of multiple flaps for the reconstruction of dorsal digital defects[J]. International Journal of Clinical & Experimental Medicine, 2015, 8(10): 18058
- [29] Anzidei M, Lucatelli P, Napoli A, et al. CT-Angiography And MR-Angiography Findings After Surgical And Interventional Radiology Treatment Of Peripheral Arterial Obstructive Disease [J]. Journal of Cardiovascular Computed Tomography, 2015, 9(3): 165-182
- [30] Hayase M, Yang T, Oda M, et al. Carotid Artery Stenting for Bilateral Cerebral Malperfusion due to Carotid Dissection after Open Surgical Repair of Type A Aortic Dissection in Marfan Syndrome: A Case Report[J]. Japanese Journal of Neurosurgery, 2015, 24(1): 41-47