

人参皂苷 Rg1 纳米粒局部注射治疗大鼠心肌梗死

曹聪聪¹, 凌耿飞², 杨春华³<https://doi.org/10.12307/2023.506>

投稿日期: 2022-07-08

采用日期: 2022-08-19

修回日期: 2022-09-27

在线日期: 2022-10-25

中图分类号:

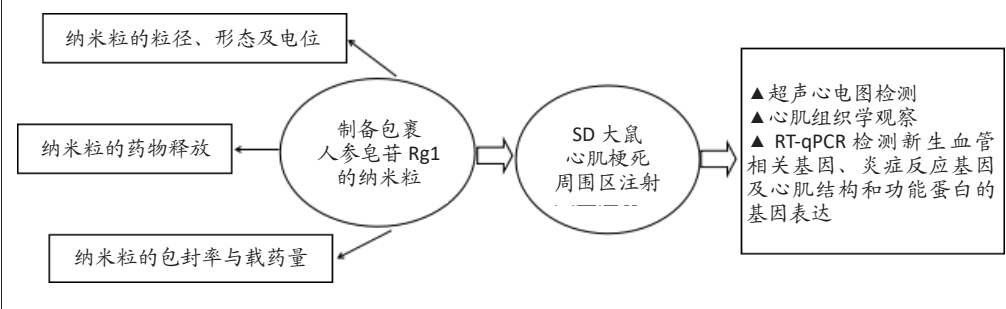
R459.9; R318.08; R543.3

文章编号:

2095-4344(2023)25-03977-07

文献标识码: A

文章快速阅读: 包裹人参皂苷 Rg1 的纳米粒应用于大鼠心肌梗死



文题释义:

人参皂苷Rg1: 为人参的主要单体成分, 已被证实具有心血管保护作用, 其可通过多种途径、不同机制改善心肌缺血再灌注损伤、抗细胞凋亡、促进心肌血管再生、改善心肌细胞肥厚、抗动脉血栓形成。

纳米级药物载体: 是一种属于纳米级微观范畴的亚微粒药物载体输送系统。将药物封装于亚微粒中, 可以调节释药的速度, 增加生物膜的透过性、改变在体内的分布、提高生物利用度等。纳米粒又称毫微粒, 是大小在10–1 000 nm之间的固态胶体颗粒, 一般由天然高分子物质或合成高分子物质构成, 可作为传导或输送药物的载体。

摘要

背景: 人参皂苷Rg1可以减轻心肌梗死小鼠的心肌细胞凋亡与炎症反应, 改善小鼠心功能, 但以往研究多是腹腔注射给药, 将人参皂苷Rg1包裹于纳米粒中应用于心肌梗死的相关研究较少。

目的: 将人参皂苷Rg1包裹于纳米粒, 观察其局部注射治疗大鼠心肌梗死的效果。

方法: 采用双乳液法制备人参皂苷Rg1纳米粒, 检测纳米粒的粒径、形态及电位、封装率与载药量以及体外药物缓释作用。选取64只雄性SD大鼠, 利用随机数字表将大鼠分成4组, 每组16只: 假手术组仅开胸, 不结扎冠状动脉左前降支; 模型组结扎冠状动脉左前降支复制心肌梗死模型; 药物组复制心肌梗死模型后, 梗死周围区注射人参皂苷Rg1溶液; 纳米粒组复制心肌梗死模型后, 梗死周围区注射人参皂苷Rg1纳米粒混悬液。造模28 d后分别进行超声心动图、心肌组织学及RT-qPCR检测。

结果与结论: ①人参皂苷Rg1纳米粒的平均粒径为(231.28±3.66) nm, Zeta电位(-24.31±3.65) mV, 透射电镜下可见该纳米粒呈圆球形, 粒径在198 nm左右, 纳米粒分散均匀, 无团聚, 纳米粒的封装率为(69.82±3.21)%, 载药量为(6.05±0.02)%, 该纳米粒可持续释放人参皂苷Rg1达30 d以上; ②超声心动图检测显示, 与假手术组相比, 模型组左心室功能与结构异常; 与模型组比较, 药物组、纳米粒组左心室功能与结构均有明显改善, 其中以纳米粒组改善更明显; ③苏木精-伊红与Masson染色显示, 模型组大鼠心肌组织纤维排列松散且不规则, 间质水肿并伴有明显充血与炎性细胞浸润, 缺血中心及周围可见大量胶原沉积; 药物组、纳米粒组大鼠心肌组织纤维排列略松散, 排列较模型组规则, 间质较少见水肿与炎性细胞浸润, 缺血中心及周围胶原沉积明显减少, 其中以纳米粒组病理改善更明显; ④RT-qPCR检测显示, 与模型组比较, 药物组、纳米粒组梗死区低氧诱导因子1α、血管性血友病因子、血管内皮生长因子A、血管生成素1、缝隙连接蛋白43、钙黏蛋白的mRNA表达量升高(P<0.05), 肿瘤坏死因子α、白细胞介素1β、干扰素γ的mRNA表达量降低(P<0.05), 其中以纳米粒组改善更明显; ⑤人参皂苷Rg1纳米粒局部给药可抑制梗死心肌组织的炎症反应及心室重塑, 改善心功能, 促进心肌组织的修复, 该作用可能通过提升成血管相关基因与心肌功能蛋白的表达、抑制炎症因子的基因表达有关。

关键词: 心肌梗死; 纳米粒; 人参皂苷Rg1; 心脏结构; 成血管; 心功能

Local injection of ginsenoside Rg1 nanoparticles in the treatment of myocardial infarction in rats

Cao Congcong¹, Ling Gengfei², Yang Chunhua³¹Zhoukou Vocational and Technical College, Zhoukou 466000, Henan Province, China; ²Department of Critical Care, ³Department of Cardiovascular Medicine, Zhoukou Central Hospital, Zhoukou 466000, Henan Province, China

Cao Congcong, Lecturer, Zhoukou Vocational and Technical College, Zhoukou 466000, Henan Province, China

Corresponding author: Yang Chunhua, Master, Associate chief physician, Department of Cardiovascular Medicine, Zhoukou Central Hospital, Zhoukou 466000, Henan Province, China¹周口职业技术学院, 河南省周口市 466000; 周口市中心医院, ²重症医学科, ³心血管内科, 河南省周口市 466000

第一作者: 曹聪聪, 女, 1987年生, 河南省南召县人, 汉族, 讲师, 主要从事基础医学教育与研究。

通讯作者: 杨春华, 硕士, 副主任医师, 周口市中心医院心血管内科, 河南省周口市 466000

<https://orcid.org/0000-0003-2738-0480> (曹聪聪)

引用本文: 曹聪聪, 凌耿飞, 杨春华. 人参皂苷 Rg1 纳米粒局部注射治疗大鼠心肌梗死 [J]. 中国组织工程研究, 2023, 27(25):3977-3983.



Abstract

BACKGROUND: Ginsenoside Rg1 can reduce myocardial cell apoptosis and inflammatory response in mice with myocardial infarction, and improve cardiac function in mice. However, most previous studies used intraperitoneal injection. There are few related studies on the application of ginsenoside Rg1 in nanoparticles for myocardial infarction.

OBJECTIVE: Ginsenoside Rg1 was coated with nanoparticles to observe the effect of local application on myocardial infarction in rats.

METHODS: Ginsenoside Rg1 nanoparticles were prepared by double emulsion method. The particle size, morphology, potential, sealing rate and drug loading of the nanoparticles, as well as the sustained drug release effect *in vitro* were detected. Sixty-four male Sprague-Dawley rats were randomly divided into four groups ($n=16$). In sham operation group, only laparotomy was performed without ligation of the left anterior descending coronary artery. In the model group, ligation of left anterior descending coronary artery was conducted to make myocardial infarction model. In the medicine group, after myocardial infarction model was established, ginsenoside Rg1 was intraperitoneally injected. In the nanoparticle group, ginsenoside Rg1 nanoparticle suspension was injected into the peri-infarct area after replicating the myocardial infarction model. Echocardiogram, myocardial histology and RT-qPCR were conducted 28 days after operation.

RESULTS AND CONCLUSION: (1) The average particle size of the ginsenoside Rg1 nanoparticles was (231.28 ± 3.66) nm and the Zeta potential was (-24.31 ± 3.65) mV. Transmission electron microscopy showed that the nanoparticles were spherical with a particle size of about 198 nm. The nanoparticles were evenly dispersed without agglomeration and the encapsulation efficiency of the nanoparticles was $(69.82 \pm 3.21)\%$. The drug load was $(6.05 \pm 0.02)\%$. The nanoparticles could release ginsenoside Rg1 for more than 30 days. (2) Echocardiogram demonstrated that compared with the sham operation group, the left ventricular function and structure of the model group were abnormal. Compared with the model group, the left ventricular function and structure were significantly improved in the medicine group and nanoparticle group; the improvement was more obvious in the nanoparticle group. (3) Hematoxylin-eosin staining and Masson staining showed that the myocardial tissue fibers of the rats in the model group were loosely arranged and irregular; the interstitial edema was accompanied by obvious congestion and inflammatory cell infiltration, and a large amount of collagen deposition was seen in and around the ischemic center. The fibers of the myocardial tissue of the rats in the medicine and nanoparticle groups were slightly loose, and the arrangement was more regular than that in the model group. The interstitial edema and inflammatory cell infiltration were less common, and the collagen deposition in and around the ischemic center was significantly reduced. Among them, the pathological improvement in the nanoparticle group was more obvious. (4) RT-qPCR detection exhibited that compared with the model group, the mRNA expression of hypoxia-inducible factor 1α , von Willebrand factor, vascular endothelial growth factor A, angiopoietin 1, connexin 43, and cadherin increased in the medicine group and nanoparticle group ($P < 0.05$), and the mRNA expression of tumor necrosis factor α , interleukin- 1β , and interferon γ decreased ($P < 0.05$), and the improvement was more obvious in the nanoparticle group. (5) Local administration of ginsenoside Rg1 nanoparticles can inhibit the inflammatory response and ventricular remodeling of infarcted myocardial tissue, improve cardiac function, and promote the repair of myocardial tissue. This effect may be associated with the expression of myocardium functional proteins and genes that inhibit inflammatory factors through the promotion of vascular-related genes.

Key words: myocardial infarction; nanoparticle; ginsenoside Rg1; cardiac structure; vascularization; cardiac function

How to cite this article: CAO CC, LING GF, YANG CH. Local injection of ginsenoside Rg1 nanoparticles in the treatment of myocardial infarction in rats. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu*. 2023;27(25):3977-3983.

0 引言 Introduction

心血管疾病已成为世界范围内人类死亡的首位原因,随着社会经济和人口老龄化的加速发展,中国心血管疾病的发病率和死亡率均持续上升,目前,中国大约有 3.3 亿人患有心血管疾病,其中冠心病患者达到 1 100 万,预计到 2030 年将有 2 360 万人死于心血管疾病^[1-2]。在心血管疾病中,心肌梗死及其心血管事件引起的死亡占心血管死亡人数的一半以上^[3]。尽管药物与冠状动脉搭桥治疗可一定程度地改善心肌梗死后的心肌缺血、降低急性期的死亡率,但是尚无有效方法改善心肌梗死晚期心肌细胞死亡所致的心室重构和心脏破裂。

纳米技术的出现为医学发展提供了多样化平台,纳米载药作为纳米医学的重要分支最初主要应用于肿瘤研究领域,近年来在心血管领域也受到了广泛关注^[4-6]。纳米粒是一种粒径介于 10–1 000 nm 的新型药物递送载体,由多种有机材料、无机材料、金属–有机框架或这些材料组合而成,可作为化学与生物制剂之间传递的媒介,应用其包裹药物可显著提高药物的稳定性与生物利用度^[7-8]。

作为人参的主要单体成分,人参皂苷 Rg1 已被证实具有心血管保护作用^[9-11],其可通过多种途径、不同机制改善心肌缺血再灌注损伤、抗细胞凋亡、促进心肌血管再生、改善心肌细胞肥厚、抗动脉血栓形成。LUO 等^[9]研究显示,人参皂苷 Rg1 可以减轻心肌梗死小鼠的心肌细胞凋亡与炎症反应,改善小鼠心功能。金岩等^[12]研究证实人参皂苷 Rg1 能够促进大鼠急性心肌梗死后心脏的血管新生。但以往研究多是

腹腔注射给药,将人参皂苷 Rg1 包裹于纳米粒中应用于心肌梗死的相关研究较少。此次实验将人参皂苷 Rg1 包裹于纳米粒,观察其局部应用治疗大鼠心肌梗死的效果,为临床治疗心肌梗死提供基础数据。

1 材料和方法 Materials and methods

1.1 设计 随机分组动物观察实验,采用单因素方差分析比较组间差异,事后检验采用 LSD-t 检验。

1.2 时间及地点 实验于 2020 年 12 月至 2021 年 3 月在郑州大学医学科学院实验动物中心完成。

1.3 材料

1.3.1 实验动物与分组 选取 64 只雄性 SD 大鼠,6 周龄,清洁级,体质量 (210 ± 20) g,购自郑州大学医学科学院实验动物中心,实验动物使用许可证号:SCXK(豫)2021-0009。在温度 (22 ± 2) °C、湿度 55%、12 h 光照/黑暗循环的环境饲养,可自由获得食物和水。利用随机数字表将大鼠分成 4 组,分别为假手术组、模型组、药物组与纳米粒组,每组 16 只。实验已获得郑州大学医学科学院实验动物中心伦理委员会批准。

1.3.2 实验试剂与仪器 人参皂苷 Rg1(纯度 98%,西安汇林生物科技有限公司);聚乳酸–羟基乙酸共聚物(上海源叶生物科技有限公司);二氯甲烷(北京百灵威科技有限公司);N-羟基琥珀酰亚胺、碳二亚胺(上海懋康生物科技有限公司);聚乙烯醇(上海弘顺生物科技有限公司);N,N-二异丙基乙胺(南京化学试剂股份有限公司);激光粒度分析仪(上海

甄明科学仪器有限公司), 高效液相色谱仪(北京元圭仪器科技有限公司); 小动物呼吸机(北京友诚生物科技有限公司); 小动物超声影像仪(北京益仁恒业科技有限公司); 透射电镜(北京中科科仪股份有限公司)。

1.4 实验方法

1.4.1 制备人参皂苷 Rg1 纳米粒 精确称量 1 g 的聚乳酸-羟基乙酸共聚物, 溶于 2 mL 无水二氯甲烷中; 将 0.3 g 的 N-羟基琥珀酰亚胺、0.1 g 的碳二亚胺溶于 1 mL 无水二氯甲烷中; 将 2 种溶液混合, 室温下搅拌反应 3 h; 吸取反应溶液滴加到冰乙醚与甲醇混合溶液(体积比为 1:1)中, 缓慢搅拌至析出沉淀, 反复洗涤沉淀 3 次; 1 500 r/min 离心 20 min 浓缩产物, 真空下抽干备用。将沉淀溶于 3 mL 无水二氯甲烷中, 加入 250 mg 的聚乙二醇和 30 mg 的 N,N-二异丙基乙胺, 继续搅拌反应 12 h, 至析出沉淀, 反复洗涤沉淀 3 次; 1 500 r/min 离心 20 min 浓缩产物, 真空下抽干, 得到聚乳酸-羟基乙酸共聚物/聚乙二醇共聚物。

将 5 mg 的人参皂苷 Rg1 溶于 1 mL 含 1% 乙酸钠的 2% 聚乙烯醇水溶液中; 称量 100 mg 的聚乳酸-羟基乙酸共聚物/聚乙二醇共聚物溶于 4 mL 无水二氯甲烷中; 将 2 种溶液混合, 冰浴中 224 W 超声乳化 60 s, 得到初乳; 向初乳中加入 12 mL 4% 聚乙烯醇溶液, 冰浴中 224 W 超声乳化 120 s, 得到复乳液, 常温下持续搅拌 6 h; 1 000 r/min 离心 10 min 去除杂物, 4 500 r/min 离心 25 min, 弃上清, 无离子水洗涤 3 次, 4 500 r/min 离心 25 min 浓缩产物, 制备得包裹人参皂苷 Rg1 的聚乳酸-羟基乙酸共聚物/聚乙二醇纳米粒, 将纳米粒溶于 2 mL PBS 中, 制得纳米粒混悬液。

1.4.2 人参皂苷 Rg1 纳米粒的粒径、形态及电位 应用激光粒度分析仪测定载药纳米粒混悬液的粒径及 Zeta 电位。取适量的纳米粒混悬液, 分散均匀, 滴加到铜片上, 1.0% 磷钨酸染色, 透射电镜下观察其表面形态。

1.4.3 人参皂苷 Rg1 纳米粒的包封率与载药量 将一定量的载药纳米粒混悬液置于离心管内, 40 000 r/min 离心 60 min, 取上清液 1 mL, 以甲醇稀释至 10 mL, 经 0.22 μm 微孔滤膜滤过, 取滤液注入高效液相色谱仪, 检测游离人参皂苷 Rg1 的质量, 记为 m_1 ; 取离心后的沉淀, 蒸馏水洗涤 3 次, 真空冷冻干燥后精密称定总质量, 记作 m 。另外精密量取载药纳米粒混悬液 1 mL, 用甲醇稀释至 10 mL, 超声, 经 0.22 μm 微孔滤膜滤过, 取滤液注入高效液相色谱仪, 计算载药纳米粒混悬液中总的药物量, 记作 m_0 。

$$\text{包封率} = (m_0 - m_1) / m$$

$$\text{载药量} = (m_0 - m_1) / m_0$$

1.4.4 人参皂苷 Rg1 纳米粒的体外缓释作用 将 10 μL 载药纳米粒混悬液置于透析袋内, 两端用透析夹夹住, 置于盛有 4 mL PBS 的棕色瓶内, 置于摇床内 37 °C 下恒温持续振荡, 振荡速率 100 r/min, 于设定的时间点各取样 20 μL, 同时补充新鲜的等量 PBS, 采用 Elisa 法检测人参皂苷 Rg1 的浓度。根据载药纳米粒中人参皂苷 Rg1 在不同时间的累计释放量,

制作体外释放曲线。

1.4.5 人参皂苷 Rg1 纳米粒的动物体内应用

复制心肌梗死模型: 取所有 SD 大鼠, 称量体质量, 腹腔注射 2% 戊巴比妥钠 (40 mg/kg) 麻醉。剔除左侧胸部毛发, 将大鼠仰卧位固定于手术台上, 消毒术区皮肤, 使用镊子牵拉出大鼠舌头, 将气管插管置入声门并与小动物呼吸机连接; 连接心电图。定位左侧第四肋间, 沿肋骨横向剪开皮肤, 暴露左心耳与左心室, 靠近左心耳下缘处用缝合线结扎冠状动脉左前降分支, 观察到结扎区心脏表面变苍白、心电图 ST 段抬高, 说明模型制备成功。造模约 10 min 后, 药物组梗死周围区注射人参皂苷 Rg1 50 μL(质量浓度 2 μg/μL); 纳米粒组梗死周围区注射人参皂苷 Rg1 纳米粒混悬液 50 μL(含人参皂苷 Rg 100 μg)^[13]。逐层缝合, 关闭呼吸机。待大鼠自主呼吸稳定时, 将其置于电热毯上保暖, 直至大鼠苏醒。

超声心动图检测: 术后 28 d, 麻醉后利用超声心动测试仪检测心功能参数, 包括射血分数、缩短分数、收缩期室间隔厚度、舒张期室间隔厚度、收缩期左心室后壁厚度、舒张期左心室后壁后厚度、左心室收缩末期直径、左心室舒张末期直径。均测量 3 个连续心动周期的平均值。

心肌组织学分析: 术后 28 d 超声心动图检测结束后, 麻醉后处死大鼠, 取心肌梗死区周围组织, 置入 40 g/L 多聚甲醛中固定 24 h, 修块后常规脱水、透明、浸蜡, 石蜡包埋, 组织切片机切片, 片厚 5 μm, 进行苏木精-伊红与 Masson 染色, 观察心肌病理损伤与纤维化程度。

RT-qPCR 检测: 利用 RT-qPCR 检测心肌梗死区成血管相关基因(低氧诱导因子 1α、血管性血友病因子、血管内皮生长因子 A、血管生成素 1)与心肌结构与功能蛋白(缝隙连接蛋白 43、钙黏蛋白)、炎症因子(肿瘤坏死因子 α、白细胞介素 1β、干扰素 γ)的 RNA 表达。取 5 mg 的心肌梗死区周围组织, 加入 500 μL 组织裂解液进行匀浆处理, 提取总 RNA; 将 1 μL RNA 溶液与 99 μL DEPC 水混合, 以 DEPC 水作空白对照, 利用紫外分光光度计检测 RNA 浓度。将 RNA 反转录为 cDNA, 反应条件: 25 °C 10 min, 48 °C 30 min, 95 °C 5 min, 将 cDNA 产物置于 -80 °C 冰箱内。进行实时荧光定量 PCR 反应, 反应条件: 95 °C 10 min, 95 °C 15 s, 60 °C 1 min, 共 40 个循环。设计引物, 见表 1。

表 1 | RT-qPCR 检测引物序列
Table 1 | Primer sequences of RT-qPCR

基因名称	正义链 (5'-3')	反义链 (5'-3')
低氧诱导因子 1α	ATG GTC GTC TTC AGG TGT	CTG GTA GTG GTA AGG GTT C
血管性血友病因子	CTG CGG CTC TAV TAC ATT G	TGC GGT GTA CTA CAT TG
血管内皮生长因子 A	ACA GAA AGT GAG GAG CAA GA	ATG GAG AAA CCA GGG AAC
肿瘤坏死因子 α	TCA CGC TGG CAG ACT TCA	GCA GGG CAA CTT GGC ATT
血管生成素 1	TTC TAC GCC ATC ACC ACG	TTC CAT CCC TTC CTT GCT
白细胞介素 1β	CGT ATC GGA CGC CTG GTT	GAA GAT GGT GAT GGG TTT
干扰素 γ	GAC TAG CTA CAT TGT CTG CTG	GTG CAG GGT CCG AGG T
缝隙连接蛋白 43	CTC GCT TCG GCA GCA CA	AAC GCT TCA CGA ATT TGC GT
钙黏蛋白	GTG CAG GGT CCG AGG T	CTC GCT TCG GCA GCA CA
GAPDH	CGT ATC GGA CGC CTC CTT	GGA AGA TGG TGA TGG GTT T

1.5 主要观察指标 各组大鼠超声心动图、心肌组织学及 RT-qPCR 检测结果。

1.6 统计学分析 实验中所得计量资料均以 $\bar{x} \pm s$ 格式表达。使用 SPSS 22.0 软件进行统计分析, 使用 EXCEL 软件进行数据记录和作图分析。采用单因素方差分析比较组间差异, 事后检验采用 LSD-t 检验。 $P < 0.05$ 显示差异有显著性意义。该文统计学方法已经周口市中心医院生物统计学专家审核。

2 结果 Results

2.1 人参皂苷 Rg1 纳米粒的粒径、形态及电位 由检测结果可知, 人参皂苷 Rg1 纳米粒的平均粒径为 (231.28 ± 3.66) nm (图 1A), Zeta 电位 (-24.31 ± 3.65) mV (图 1B), 透射电镜下可见该纳米粒呈圆球形, 粒径在 198 nm 左右, 纳米粒分散均匀, 无团聚 (图 1C)。

2.2 人参皂苷 Rg1 纳米粒的包封率与载药量 人参皂苷 Rg1 纳米粒的包封率为 $(69.82 \pm 3.21)\%$, 载药量为 $(6.05 \pm 0.02)\%$ 。

2.3 人参皂苷 Rg1 纳米粒的体外缓释作用 人参皂苷 Rg1 纳米粒的体外缓释作用曲线见图 2, 结果可见: 纳米粒在前 10 d 快速释放人参皂苷 Rg1, 累计释放量达到 $(72.08 \pm 2.37)\%$, 此后纳米粒释放人参皂苷 Rg1 的速率减慢, 至 30 d 时累计释放人参皂苷 Rg1 达到 $(88.21 \pm 5.39)\%$ 。

2.4 人参皂苷 Rg1 纳米粒的动物体内应用

2.4.1 实验动物数量分析 造模过程中无大鼠死亡, 因此, 实验纳入的 64 只大鼠全部进入结果分析。

2.4.2 超声心动图检测结果 见图 3。

术后 28 d, 与假手术组相比, 模型组大鼠左心室射血分数、缩短分数、舒张期室间隔厚度、收缩期室间隔厚度、舒张期左心室后壁厚度、收缩期左心室后壁厚度减少 ($P < 0.05$), 左心室舒张末期直径、左心室收缩末期直径增加 ($P < 0.05$)。与模型组比较, 药物组、纳米粒组大鼠左心室射血分数、缩短分数、舒张期室间隔厚度、收缩期室间隔厚度、舒张期左心室后壁厚度、收缩期左心室后壁厚度增加 ($P < 0.05$), 左心室舒张末期直径、左心室收缩末期直径减少 ($P < 0.05$)。与药物组比较, 纳米粒组大鼠的左心室射血分数、缩短分数、舒张期室间隔厚度、收缩期室间隔厚度、舒张期左心室后壁厚度、收缩期左心室后壁厚度增加 ($P < 0.05$), 左心室舒张末期直径、左心室收缩末期直径减少 ($P < 0.05$)。

2.4.3 心肌组织学分析 术后 28 d, 苏木精-伊红染色显示, 假手术组大鼠心肌组织排列规则有序, 细胞形态正常, 未见病理形态改变; 模型组大鼠心肌组织纤维排列松散且不规则, 心肌纤维间距增大, 胞质肿胀, 间质水肿并伴有明显充血与炎性细胞浸润; 药物组、纳米粒组大鼠心肌组织纤维排列略松散, 排列较模型组规则, 心肌纤维间距缩小, 间质较少见水肿与炎性细胞浸润, 其中以纳米粒组病理改善更明显, 见图 4。

Masson 染色显示, 假手术组心肌纤维排列规则有序; 与假手术组比较, 模型组大鼠心肌纤维排列紊乱, 部分纤维

断裂, 缺血中心及周围可见大量胶原沉积; 药物组、纳米粒组大鼠心肌纤维排列较规则, 缺血中心及周围胶原沉积明显减少, 其中以纳米粒组胶原沉积更少, 见图 5。

胶原面积定量分析结果显示, 假手术组、模型组、药物组、纳米粒组大鼠心肌组织胶原面积百分比分别为 $(5.31 \pm 0.38)\%$, $(72.57 \pm 6.97)\%$, $(53.02 \pm 3.88)\%$, $(39.74 \pm 7.19)\%$; 其中, 模型组胶原面积百分比大于假手术组 ($P < 0.05$), 药物组胶原面积百分比小于模型组 ($P < 0.05$), 纳米粒组胶原面积百分比小于药物组 ($P < 0.05$)。

2.4.4 RT-qPCR 检测结果 各组心肌组织各基因表达量检测结果, 见图 6。

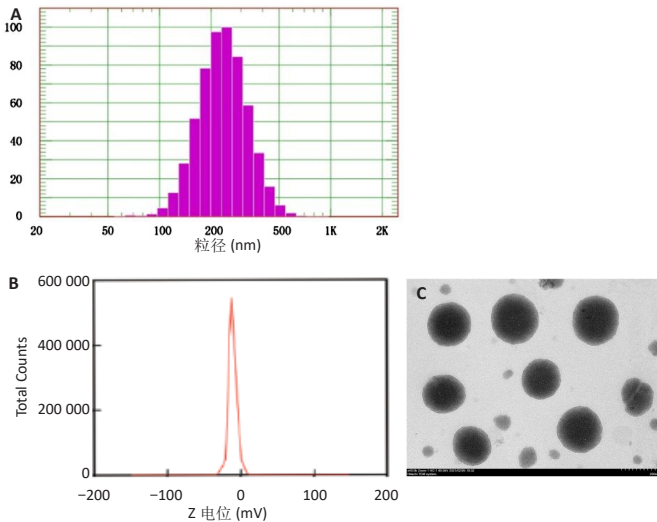
检测结果显示, 与假手术组比较, 模型组缝隙连接蛋白 43、钙黏蛋白的 mRNA 表达量明显降低 ($P < 0.05$), 低氧诱导因子 1 α 、血管性血友病因子、血管内皮生长因子 A、血管生成素 1、肿瘤坏死因子 α 、白细胞介素 1 β 、干扰素 γ 的 mRNA 表达量明显升高 ($P < 0.05$)。与模型组比较, 药物组低氧诱导因子 1 α 、血管性血友病因子、血管内皮生长因子 A、血管生成素 1、缝隙连接蛋白 43、钙黏蛋白的 mRNA 表达量明显升高 ($P < 0.05$), 肿瘤坏死因子 α 、白细胞介素 1 β 、干扰素 γ 的 mRNA 表达量明显降低 ($P < 0.05$)。与药物组比较, 纳米粒组低氧诱导因子 1 α 、血管性血友病因子、血管内皮生长因子 A、血管生成素 1、缝隙连接蛋白 43、钙黏蛋白的 mRNA 表达量明显升高 ($P < 0.05$), 肿瘤坏死因子 α 、白细胞介素 1 β 、干扰素 γ 的 mRNA 表达量明显降低 ($P < 0.05$)。

2.4.5 纳米粒的生物相容性 由动物实验结果可知, 人参皂苷 Rg1 纳米粒具有良好的生物相容性。

3 讨论 Discussion

冠状动脉部分或全部阻塞将会引发相应区域的缺血、缺氧, 造成心肌细胞死亡, 导致心肌梗死的发生^[14-15]。当心肌梗死发生后, 大量的炎症细胞浸润会使胶原蛋白遭到破坏^[16-17], 导致梗死区域厚度下降, 随后成纤维细胞在梗死区域沉积大量胶原, 形成瘢痕组织来阻止梗死灶的扩大, 即发生梗死后重塑; 但是重塑会拉伸剩余存活的心肌细胞, 致使心室壁张力随着心室半径的增大而增加, 这会增加剩余存活心肌细胞的负担, 引发心内膜下心肌缺血, 造成更大的伤害——心力衰竭^[18-20]。对于急性心肌梗死可以采用经皮冠状动脉介入与冠状动脉搭桥治疗, 可以减少缺血性心肌面积, 阻止梗死灶的进一步发展^[21-23]; 对于心肌梗死后的康复期主要通过药物来控制心室的不良重塑, 但是传统给药治疗具有一定的局限性, 存在血浆半衰期短、药物清除速度过快、药物非病变器官分布及不良反应大等问题^[24-25]。因此, 寻找能有效控制心肌梗死及梗死后并发症的新型药物递送策略是心肌梗死治疗的热点研究。

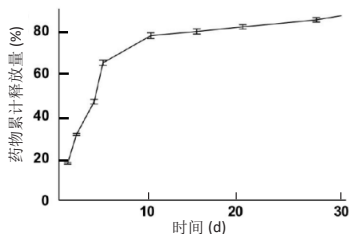
相较于传统给药治疗, 纳米载药可以根据不同病理机制及治疗策略, 将不同的配体引入相应纳米载体中并靶向结合病变部位, 更有效针对梗死区域提高药物浓度以改善心肌



图注: A 为纳米粒的粒径, 平均粒径为 (231.28 ± 3.66) nm; B 为纳米粒的 Zeta 电位, 为 (-24.31 ± 3.65) mV; C 为纳米粒的透射电镜观察, 呈球形, 粒径在 198 nm 左右, 纳米粒分散均匀, 标尺 = 200 nm

图 1 | 人皂苷 Rg1 纳米粒的粒径、形态及电位

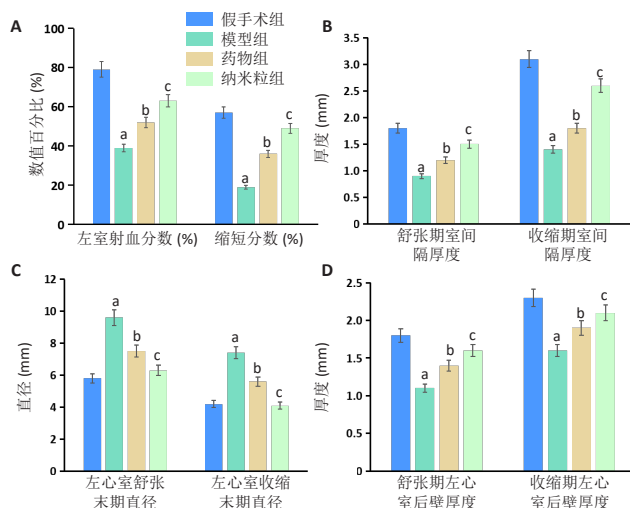
Figure 1 | Particle size, morphology and potential of ginsenoside Rg1 nanoparticles



图注: 纳米粒在前 10 d 快速释放人参皂苷 Rg1, 累计释放量达到 $(72.08 \pm 2.37)\%$, 此后纳米粒释放人参皂苷 Rg1 的速率减慢, 至 30 d 时累计释放人参皂苷 Rg1 达到 $(88.21 \pm 5.39)\%$

图 2 | 人皂苷 Rg1 纳米粒的体外缓释作用曲线

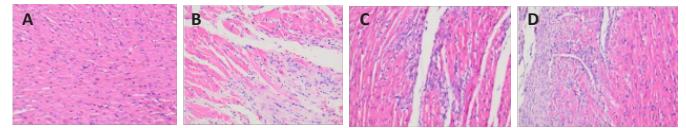
Figure 2 | Sustained-release curves of ginsenoside Rg1 nanoparticles in vitro



图注: A 为左室射血分数与缩短分数, B 为舒张期与收缩期室间隔厚度, C 为左心室舒张末期与收缩末期直径, D 为舒张期与收缩期左心室后壁厚度。与假手术组比较, $^aP < 0.05$; 与模型组比较, $^bP < 0.05$; 与药物组比较, $^cP < 0.05$

图 3 | 各组大鼠超声心动图检测结果

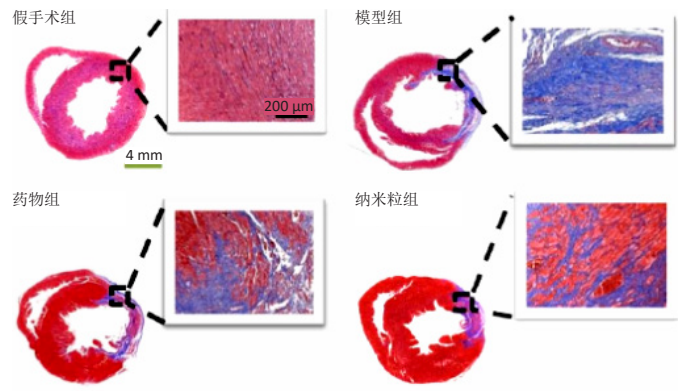
Figure 3 | Results of echocardiography of rats in each group



图注: A 为假手术组, 心肌组织排列规则有序, 细胞形态正常, 未见病理形态改变; B 为模型组, 心肌组织纤维排列松散且不规则, 心肌纤维间距增大, 胞质肿胀, 间质水肿并伴有明显充血与炎性细胞浸润; C、D 分别为药物组、纳米粒组, 心肌组织纤维排列略松散, 排列较模型组规则, 心肌纤维间距缩小, 间质较少见水肿与炎性细胞浸润, 以纳米粒组病理改善更明显

图 4 | 各组大鼠心肌组织苏木精 - 伊红染色 ($\times 200$)

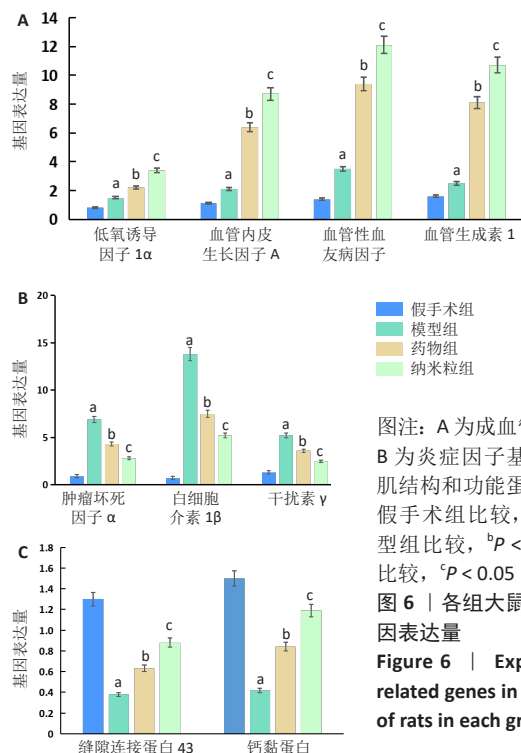
Figure 4 | Hematoxylin-eosin staining of myocardial tissue of rats in the four groups ($\times 200$)



图注: 假手术组心肌纤维排列规则有序; 与假手术组比较, 模型组大鼠心肌纤维排列紊乱, 部分纤维断裂, 缺血中心及周围可见大量胶原沉积; 药物组、纳米粒组大鼠心肌纤维排列较规则, 缺血中心及周围胶原沉积明显减少, 其中以纳米粒组胶原沉积更少

图 5 | 各组大鼠心肌组织 Masson 染色

Figure 5 | Masson staining of myocardial tissue of rats in each group



图注: A 为成血管相关基因表达, B 为炎症因子基因表达, C 为心肌结构和功能蛋白基因表达。与假手术组比较, $^aP < 0.05$; 与模型组比较, $^bP < 0.05$; 与药物组比较, $^cP < 0.05$

图 6 | 各组大鼠心肌组织相关基因表达量

Figure 6 | Expression levels of related genes in myocardial tissue of rats in each group

血运,具备靶向治疗能力^[26-27]。许多的天然、人工合成及半人工合成生物高分子材料被用于制备纳米微球。聚乳酸-羟基乙酸共聚物是一种可生物降解的高分子材料,为FDA批准的聚合物,具有良好的生物相容性与生物降解性,是药物递送系统中应用最为广泛的聚合物之一^[28-29]。聚乙二醇作为一种线性聚醚二醇具有极强的溶解性,且无毒、无免疫原性、无抗原性,可改善材料的亲水性,起到稳定剂的作用,也为FDA批准的聚合物,常用于纳米粒修饰^[30]。聚乙二醇的修饰可以改善聚乳酸-羟基乙酸共聚物的亲水性较差、降解过慢等不足。聚乳酸-羟基乙酸共聚物/聚乙二醇纳米粒已被广泛用于药物控释及组织工程领域。YANG等^[31]研究显示,聚乳酸-羟基乙酸共聚物/聚乙二醇纳米粒纳米颗粒可以提高岩藻黄质的生物利用度,增强其治疗阿尔茨海默症的疗效。晏殊瑾等^[32]制备了低强度脉冲超声靶向控释基质细胞衍生因子1 α 、骨形态发生蛋白2的聚乳酸-羟基乙酸共聚物/聚乙二醇纳米粒,该体系能有效促进人牙周膜干细胞迁移和成骨分化。基于以上研究结果,此次实验以聚乳酸-羟基乙酸共聚物/聚乙二醇纳米粒为药物控释载体,包裹人参皂苷Rg1,用于治疗大鼠心肌梗死。

为检测包裹人参皂苷Rg1聚乳酸-羟基乙酸共聚物/聚乙二醇纳米粒的治疗作用,以局部注射人参皂苷Rg1溶液为对照,实验结果显示:由于模型组没有进行任何治疗,左心室射血分数与缩短分数显著下降,无论是舒张期还是收缩期,大鼠左心室室间隔厚度与壁厚厚度均减少,致使左心室直径增大,心肌梗死情况加重。而人参皂苷Rg1局部注射给药与纳米粒给药均可有效抑制心肌梗死后重塑,改善心脏功能,并且纳米粒用药组改善作用优于人参皂苷Rg1局部注射给药。作者分析纳米粒给药组治疗效果更明显的原因是:针对心肌梗死的发病情况,包裹人参皂苷Rg1的纳米粒能够实现逐级释放,早期快速释放人参皂苷Rg1可以针对梗死灶严重的炎症反应及时对症下药,减轻炎症反应,而人参皂苷Rg1的可持续释放可长期维持促血管化作用,有效改善心肌梗死微环境,进而抑制左心室的不良重构,恢复心脏功能。体外缓释作用结果显示,在前10 d内纳米粒可快速释放人参皂苷Rg1,而后缓慢持续释放人参皂苷Rg1可达30 d以上,持续发挥药效,与体内实验结果相符。

心肌组织病理观察结果显示,模型组心肌组织纤维化严重,炎症反应明显,经过药物治疗后心肌纤维化程度得到明显抑制,炎症反应得到明显抑制,其中纳米粒给药组正常心肌组织保持较完整、心脏结构较完善,明显优于药物溶液注射给药。

为了更加直观地观察载药纳米粒对心肌梗死的治疗作用及对心功能的改善作用,采用RT-qPCR检测了包括新生血管相关基因、炎症反应基因及心肌结构和功能蛋白的表达情况。心肌梗死后心肌组织缺氧缺血,提升心脏内血管化就成为心肌梗死治疗得到关键问题。低氧诱导因子1 α 、血管性血友

病因子、血管内皮生长因子A及血管生成素1均是成血管相关基因^[33-34],此次实验结果显示,人参皂苷Rg1治疗可提高梗死心肌组织内成血管相关基因的表达,但是不同治疗组间存在明显的差异,纳米粒给药组提升作用强于药物直接注射,说明纳米粒给药可在心肌梗死局部持续促进血管生成,打开梗死的血流通道,改善心功能。适度的炎症反应有利于机体组织修复,但是过度的炎症反应将加重组织损伤,不利于组织修复^[35]。心肌梗死后心脏发生严重的炎症反应,不利于心肌组织的修复,因此,抑制炎症反应也是心肌梗死治疗的重点内容。此次实验结果显示,人参皂苷Rg1可明显抑制心肌梗死区炎症反应,纳米粒给药组抑制效果更加显著,说明早期迅速释放的人参皂苷Rg1有效抑制了心肌梗死不利于组织修复的炎症微环境,后期继续持续释放药物保持组织修复需要的良好微环境,促进心肌组织修复。另外,心肌梗死后由于左心室重塑将导致心脏结构与功能的改变。缝隙连接是介导心肌细胞间信息交流和能量传导的重要结构,其中的缝隙连接蛋白43为心室缝隙连接的主要组成成分,其结构、分布与表达影响心脏的功能^[36]。钙黏蛋白是血管内皮细胞表面特异性表达的跨膜黏附蛋白,亦是血管内皮细胞黏附连接的主要黏附蛋白,参与调节各种细胞增殖、凋亡及血管内皮生长因子受体的功能,对于维持血管内皮细胞的完整性用户血管内环境具有重要意义^[37]。此次实验结果显示,纳米粒给药可显著提升梗死心肌组织内缝隙连接蛋白43与钙黏蛋白的表达,缓解心室重塑,促进心脏结构与功能的恢复。

综上所述,人参皂苷Rg1溶液直接注射给药与包裹人参皂苷Rg1纳米粒局部注射给药均可抑制梗死心肌组织的炎症反应及心室重塑,改善心功能,促进心肌组织的修复,其中纳米粒局部给药的治疗作用显著优于药物溶液局部注射给药,该作用可能通过提升成血管相关基因与心肌功能蛋白的表达、抑制炎症因子的基因表达有关。但是,实验还存在许多不足:实验的时间点设置较单一,未来应增加时间点,动态观察纳米粒给药的治疗作用;对于人参皂苷Rg1的剂量仍有待考察,以筛选更加有效的治疗剂量;未明确纳米粒的具体释放药物机制;这些都是未来需要继续探索的内容。

作者贡献:曹聪聪进行实验设计,实验实施为曹聪聪、凌耿飞,实验评估为杨春华,资料收集为凌耿飞,曹聪聪成文,杨春华审核。

利益冲突:文章的全部作者声明,在课题研究和文章撰写过程中不存在利益冲突。

开放获取声明:这是一篇开放获取文章,根据《知识共享许可协议》“署名-非商业性使用-相同方式共享4.0”条款,在合理引用的情况下,允许他人以非商业性目的基于原文内容编辑、调整和扩展,同时允许任何用户阅读、下载、拷贝、传递、打印、检索、超级链接该文献,并为之建立索引,用作软件的输入数据或其它任何合法用途。

版权转让:文章出版前全体作者与编辑部签署了文章版权转让协议。

出版规范:该研究遵守国际医学期刊编辑委员会《学术研究实验与报告和医学期刊编辑与发表的推荐规范》。文章出版前已经过专业反剽窃文献检测系统进行3次查重。文章经小同行外审专家双盲外审,同行评议认为文章符合期刊发表宗旨。

4 参考文献 References

- [1] CHEN R, XIAO Y, CHEN M, et al. A traditional Chinese medicine therapy for coronary heart disease after percutaneous coronary intervention: a meta-analysis of randomized, double-blind, placebo-controlled trials. *Biosci Rep.* 2018;38(5):BSR20180973.
- [2] 中国心血管健康与疾病报告 2019 概要 [J]. 心脑血管病防治, 2020, 20(5):437-450.
- [3] YANAMANDALA M, ZHU W, GARRY DJ, et al. Overcoming the roadblocks to cardiac cell therapy using tissue engineering. *J Am Coll Cardiol.* 2017; 70(6):766-775.
- [4] BLANCO-FERNANDEZ B, CASTAÑO O, MATEOS-TIMONEDA MÁ, et al. Nanotechnology Approaches in Chronic Wound Healing. *Adv Wound Care (New Rochelle).* 2021;10(5):234-256.
- [5] LUO Y, WANG Q, ZHANG Y. Biopolymer-Based Nanotechnology Approaches To Deliver Bioactive Compounds for Food Applications: A Perspective on the Past, Present, and Future. *J Agric Food Chem.* 2020;68(46):12993-13000.
- [6] BAYDA S, ADEEL M, TUCCINARDI T, et al. The History of Nanoscience and Nanotechnology: From Chemical-Physical Applications to Nanomedicine. *Molecules.* 2019;25(1):112.
- [7] TIBURCIUS S, KRISHNAN K, YANG JH, et al. Silica-Based Nanoparticles as Drug Delivery Vehicles for Prostate Cancer Treatment. *Chem Rec.* 2021;21(6):1535-1568.
- [8] TALAT A, KHAN AU. Patents in chemotherapy: nanoparticles as drug-delivery vehicles. *Pharm Pat Anal.* 2020;9(4):117-119.
- [9] LUO M, YAN D, SUN Q, et al. Ginsenoside Rg1 attenuates cardiomyocyte apoptosis and inflammation via the TLR4/NF- κ B/NLRP3 pathway. *J Cell Biochem.* 2020;121(4):2994-3004.
- [10] LU ML, WANG J, SUN Y, et al. Ginsenoside Rg1 attenuates mechanical stress-induced cardiac injury via calcium sensing receptor-related pathway. *J Ginseng Res.* 2021;45(6):683-694.
- [11] HUANG L, CAI HA, ZHANG MS, et al. Ginsenoside Rg1 promoted the wound healing in diabetic foot ulcers via miR-489-3p/Sirt1 axis. *J Pharmacol Sci.* 2021;147(3):271-283.
- [12] 金岩, 刘国男. 人参皂甙 Rg1 对急性心肌梗死大鼠血管新生的作用 [J]. 中国医科大学学报, 2007, 36(5):517-519.
- [13] MARUYAMA K, NAEMURA K, YOSHIHARA K, et al. Surgical protocol for permanent ligation of the left anterior descending coronary artery in mice to generate a model of myocardial infarction. *STAR Protoc.* 2021;2(3):100775.
- [14] BORGHI C, BENTIVENGA C, COSENTINO ER. Uric acid and risk of myocardial infarction. A dynamic duo. *Int J Cardiol.* 2020;320:23-24.
- [15] CRITCHER CR, SIEGEL M. Re-examining the Association Between E-Cigarette Use and Myocardial Infarction: A Cautionary Tale. *Am J Prev Med.* 2021;61(4):474-482.
- [16] PEET C, IVETIC A, BROMAGE DI, et al. Cardiac monocytes and macrophages after myocardial infarction. *Cardiovasc Res.* 2020;116(6):1101-1112.
- [17] TOMOAI R, BEYER RS, SIMU G, et al. Understanding the role of echocardiography in remodeling after acute myocardial infarction and development of heart failure with preserved ejection fraction. *Ultrason.* 2019;21(1):69-76.
- [18] JENČA D, MELENOVSKÝ V, STEHLIK J, et al. Heart failure after myocardial infarction: incidence and predictors. *ESC Heart Fail.* 2021;8(1):222-237.
- [19] RUDDOX V, SANDVEN I, MUNKHAUGEN J, et al. Atrial fibrillation and the risk for myocardial infarction, all-cause mortality and heart failure: A systematic review and meta-analysis. *Eur J Prev Cardiol.* 2017;24(14):1555-1566.
- [20] TOMOAI R, BEYER RS, SIMU G, et al. Understanding the role of echocardiography in remodeling after acute myocardial infarction and development of heart failure with preserved ejection fraction. *Med Ultrason.* 2019;21(1):69-76.
- [21] KOC L, ONDRUS T, FILA P, et al. Right ventricular myocardial infarction in the era of primary percutaneous coronary intervention. *Bratisl Lek Listy.* 2021;122(10):700-707.
- [22] XIAO M, LI Y, GUAN X. Community-Based Physical Rehabilitation After Percutaneous Coronary Intervention for Acute Myocardial Infarction. *Tex Heart Inst J.* 2021;48(2):e197103.
- [23] FOKIN AA, KIREEV KA, NETISANOV SV. [Coronary artery bypass grafting in non-ST-segment elevation acute myocardial infarction]. *Angiol Sosud Khir.* 2020;26(3):142-149.
- [24] WU X, REBOLL MR, KORF-KLINGEBIEL M, et al. Angiogenesis after acute myocardial infarction. *Cardiovasc Res.* 2021;117(5):1257-1273.
- [25] MAHTTA D, SUDHAKAR D, KONERU S, et al. Targeting Inflammation After Myocardial Infarction. *Curr Cardiol Rep.* 2020;22(10):110.
- [26] DENG Y, ZHANG X, SHEN H, et al. Application of the Nano-Drug Delivery System in Treatment of Cardiovascular Diseases. *Front Bioeng Biotechnol.* 2020;7:489.
- [27] FORINI F, CANALE P, NICOLINI G, et al. Mitochondria-Targeted Drug Delivery in Cardiovascular Disease: A Long Road to Nano-Cardio Medicine. *Pharmaceutics.* 2020;12(11):1122.
- [28] FU Y, TAN L, MENG L, et al. Therapeutic Effects of Paclitaxel Loaded Polyethylene Glycol-Polylactic Acid-Glycolic Acid Copolymer Nanoparticles on Pancreatic Cancer in Rats. *J Nanosci Nanotechnol.* 2020;20(12):7271-7275.
- [29] HUA Y, SU Y, ZHANG H, et al. Poly(lactic-co-glycolic acid) microsphere production based on quality by design: a review. *Drug Deliv.* 2021;28(1):1342-1355.
- [30] SONG F, CHEN L, LIN R, et al. Synthesis of carboxy-polyethylene glycol-amine (CA (PEG)_n) and [1-14 C]-CA (PEG)_n via oxa-Michael addition of amino-polyethylene glycols to propiolates vs to acrylates. *J Labelled Comp Radiopharm.* 2020;63(1):15-24.
- [31] YANG M, JIN L, WU Z, et al. PLGA-PEG Nanoparticles Facilitate In Vivo Anti-Alzheimer's Effects of Fucoxanthin, a Marine Carotenoid Derived from Edible Brown Algae. *J Agric Food Chem.* 2021;69(34):9764-9777.
- [32] 晏殊瑾, 杨珂, 王河, 等. 低强度脉冲超声靶向纳米粒控释 SDF-1 及 BMP-2 调节 hPDLs 迁移和成骨分化 [J]. 中国超声医学杂志, 2022, 38(2):222-226.
- [33] WANG B, ZHANG C, CHU D, et al. Astragaloside IV improves angiogenesis under hypoxic conditions by enhancing hypoxia-inducible factor-1 α SUMOylation. *Mol Med Rep.* 2021;23(4):244.
- [34] DARDEN J, PAYNE LB, ZHAO H, et al. Excess vascular endothelial growth factor-A disrupts pericyte recruitment during blood vessel formation. *Angiogenesis.* 2019;22(1):167-183.
- [35] JUBAN G, MOUNIER R. [Tissue repair: Key role of annexin A1 in the control of inflammatory response]. *Med Sci (Paris).* 2021;37(4):324-326.
- [36] TOTLAND MZ, RASMUSSEN NL, KNUDSEN LM, et al. Regulation of gap junction intercellular communication by connexin ubiquitination: physiological and pathophysiological implications. *Cell Mol Life Sci.* 2020;77(4):573-591.
- [37] LAI Y, FOIS G, FLORES JR, et al. Inhibition of calcium-triggered secretion by hydrocarbon-stapled peptides. *Nature.* 2022;603(7903):949-956.

(责任编辑: GW, ZN, ZIP)