

木犀草素纳米制剂通过介导 ERK/p38 MAPK/JNK 改善体内外氧化应激损伤作用机制研究

梁 晨¹, 王叶叶¹, 江 羽¹, 谭立伟^{1,2}, 谭 睿^{1,2*}

¹西南交通大学医学院; ²西南交通大学生命科学与工程学院, 成都 610031

摘要:为探讨木犀草素-泊洛沙姆纳米制剂对体内外氧化应激损伤的改善作用。实验使用泊洛沙姆(F127)包裹木犀草素制备纳米胶束并对其进行表征,采用透析法评价其体外释放行为。建立体外H₂O₂诱导PC12细胞氧化应激损伤模型,对各组细胞进行活性检测和细胞骨架染色。利用western-blot检测各组细胞中MAPK的磷酸化水平。通过中动脉线栓阻断法建立大鼠右侧大脑缺血再灌注损伤模型(MCAO)用于评价其体内氧化应激损伤,测定各组大鼠脑梗死体积、脑含水量及血浆中氧化应激水平(SOD、MDA、GSH-Px)。最后对木犀草素纳米制剂在大鼠体内的药代动力学进行研究。结果显示,木犀草素纳米制剂多呈球形,粒径均一,载药量和包封率较高,且木犀草素可以缓慢地从胶束中释放出来。体内外抗氧化应激作用表明,木犀草素纳米制剂可显著提高细胞存活率,降低p-JNK、p-p38、p-ERK表达($P < 0.01$),且细胞骨架清晰呈网状结构。同时木犀草素纳米制剂可显著降低大鼠脑梗死体积($P < 0.05$),上调SOD、GSH-Px水平($P < 0.01$),下调MDA水平($P < 0.01$),显著提高了其抗氧化应激损伤作用。其机制与木犀草素纳米制剂延长了其体内循环时间,提高了血药浓度,通过抑制MAPK信号转导途径的激活有效减少了细胞凋亡有关。

关键词:纳米药物;木犀草素纳米制剂;氧化应激;脑缺血再灌注损伤

中图分类号:R944.9

文献标识码:A

文章编号:1001-6880(2019)5-0753-08

DOI:10.16333/j.1001-6880.2019.5.003

Mechanism of luteolin nano-formulation on alleviating oxidative stress injury by inhibiting ERK/p38 MAPK/JNK *in vitro* and *in vivo*

LIANG Chen¹, WANG Ye-ye¹, JIANG Yu¹, TAN Li-wei^{1,2}, TAN Rui^{1,2*}

¹College of Medicine, Southwest Jiaotong University;

²College of Life Science and Engineering, Southwest Jiaotong University, Chengdu 610031, China

Abstract: To explore the effect of luteolin-poloxamer nano-formulation on alleviating oxidative stress injury *in vitro* and *in vivo*. The nano-formulation was prepared by coating luteolin with F127 and characterized. The *in vitro* release behavior was determined by dialysis method. The H₂O₂-induced oxidative stress injury model of PC12 cells *in vitro* was established. For each group of cells, performing activity detection and cytoskeletal staining. The phosphorylation level of MAPK in each group of cells was detected by western-blot. The rat model of right cerebral ischemia-reperfusion injury was established by middle cerebral artery occlusion (MCAO) to evaluate the oxidative stress injury *in vivo*, and the cerebral infarction volume, brain water content and oxidative stress level in plasma (SOD, MDA, GSH-Px) were measured in each group. Finally, the pharmacokinetics of luteolin nano-formulation in rats was studied. The results showed that the luteolin nano-formulation is spherical with uniform particle size, high drug loading and encapsulation efficiency. Besides, the luteolin could be slowly released from the nano-formulation. The effect of alleviating oxidative stress *in vivo* and *in vitro* indicated that the luteolin nano-formulation could significantly improve cell viability and decrease p-JNK, p-P38 and p-ERK expression ($P < 0.01$). Meanwhile, the cytoskeleton clearly showed a reticulated structure. The luteolin nano-formulation could significantly reduce the volume of cerebral infarc-

tion in rats ($P < 0.05$) , up-regulated SOD and GSH-Px levels ($P < 0.01$) , and down-regulated MDA levels ($P < 0.01$) . The effect of alleviating oxidative stress injury was significantly improved. It concluded that the luteolin nano-formulation could prolong its circulation time in vivo and increase its blood concentration, effectively reducing apoptosis by inhibiting MAPK signal transduction pathway activation.

Key words: nano medicine; luteolin nano-formulation; oxidative stress; cerebral ischemia-reperfusion injury

氧化应激是指机体内活性氧(ROS)聚集过多,体内清除氧自由基与氧化物质失衡,造成了组织细胞氧化损伤^[1]。大量研究表明,氧化应激是造成脑缺血再灌注损伤的主要因素。脑缺血再灌注期间,ROS过度生成,而ROS能够直接与缺血脑组织细胞中的大分子物质如核酸、脂质及蛋白发生过氧化,造成脑组织不可逆的损伤^[2]。同时,过量氧自由基的产生会进一步损伤内皮细胞,引起脑组织的微循环障碍和血脑屏障(BBB)通透性增加,导致外源性物质进入脑组织,加重脑损伤^[3]。再灌注期间产生的NO会抑制线粒体呼吸链,介导其他相关毒性自由基的产生,诱导细胞凋亡^[4]。因此,消除过多的ROS与抑制细胞凋亡可对治疗缺血性脑损伤提供有益的干预^[5]。

木犀草素是一种天然黄酮类化合物,近年来研究发现木犀草素具有抗氧化、改善缺血引起的脑损伤及抗细胞凋亡等作用^[6]。其结构中的羰基可以作为氢供体来还原自由基,具有良好的抗氧化作用^[7]。然而,其水溶性差、代谢快等缺点极大地限制了木犀草素的临床应用^[8]。因此改善此类活性药物缺陷的传输体系亟待研发。研究表明,木犀草素可通过纳米技术制备成聚合物胶束来实现提高其溶解性和稳定性,增强药效的目的^[9]。其中,由聚氧乙烯(PEO)-聚氧丙烯(PPO)-聚氧乙烯(PEO)组成的三嵌段共聚物泊洛沙姆以其低毒、低免疫原性和生物相容性等好的优点,在胶束载药领域的研究中倍受青睐^[10]。因此,本文采用泊洛沙姆(F127)包裹木犀草素制备纳米胶束,对木犀草素纳米制剂在体内外抗氧化应激损伤作用及机制进行研究。

1 材料与试剂

1.1 材料

木犀草素对照品(纯度≥99.7%,成都普思生物科技公司,批号:180314);香叶木素标准品(纯度≥99.7%,成都普思生物科技公司,批号:180321);泊洛沙姆(F127)(Sigma,批号:P2443);大鼠肾上腺嗜铬瘤细胞(PC12细胞,中国科学院上海细胞所);

SPF 级雄性 SD 大鼠(280~300 g, 成都达硕实验动物有限公司)。

1.2 试剂

药用级乙醇(阿拉丁试剂公司,批号:C1816012);高糖 DMEM 培养基(Hyclone,批号:J180003);四甲基偶氮唑盐(MTT粉末,锐赛生物公司,批号:180315);2,3,5-氯化三苯基四氮唑(TTC)(源叶生物科技有限公司,批号:BCBR5460V);4%多聚甲醛(Biosharp,批号:180119);H₂O₂溶液(无锡市苏强化工有限公司,批号:20180322);β-Actin Mouse Monoclonal Antibody(碧云天生物技术公司,批号:AF0003);FITC 标记山羊抗小鼠 IgG(H+L)(碧云天生物技术公司,批号:A0562);DAPI(谷歌生物有限公司,批号:20180326);鼠抗人 p-JNK、p-ERK、p-p38 单克隆抗体(Servicebio,批号:GB12001);HRP 标记山羊抗鼠的二抗(Servicebio,批号:GB23301);SOD、MDA、GSH-Px 检测试剂盒(南京建成生物工程研究所,批号:20180206),其余试剂均为分析纯。

2 实验方法

2.1 木犀草素纳米制剂的制备与表征

将 5 mg 木犀草素对照品和 100 mg 的 F127 共同分散在 5 mL H₂O 中,超声 10 min 至溶液澄清,过 0.22 μm 滤膜除去热源及未被包裹的药物,冻干备用^[11]。将制备好的胶束通过马尔文粒度仪测定其粒径大小和分布,同时采用透射电镜观察其形貌。通过 HPLC 对其载药量和包封率进行测定。色谱条件:色谱柱:phenomenex-C₁₈;流动相:甲醇-0.2%磷酸(55:45);流速:1.0 mL/min。

$$\text{包封率} = (\text{胶束内木犀草素的含量}/\text{投药量}) \times 100\%$$

$$\text{载药量} = (\text{胶束内木犀草素的含量}/\text{胶束的总质量}) \times 100\%$$

通过透析方法研究木犀草素纳米胶束的体外释放行为。准确移取 2 mL 木犀草素纳米胶束溶液(N-Lu)至透析袋(截留分子量:8 000 Da)中,密封后置于 20 mL 的磷酸盐缓冲溶液(pH=7.4),37 °C

空气浴中进行体外释放实验。在释放 1、2、4、8、12、24、48、72、96、120 h 后, 分别取出等分试样 2 mL 透析液, 并用相同量的磷酸盐缓冲溶液代替。通过 HPLC 测量在指定时间点释放的木犀草素的量。同时采用相同浓度的木犀草素/二甲亚砜(DMSO)溶液作为游离木犀草素组(F-Lu)进行考察。

2.2 木犀草素纳米制剂对 PC12 细胞氧化应激损伤的影响

将 PC12 细胞接种于含有 10% 胎牛血清、1% 双抗的高糖 DMEM 培养基中, 于 37 °C、5% CO₂ 培养箱中培养, 取对数生长期的 PC12 细胞按照 2×10^4 个/孔接种于 96 孔板中, 设置对照组(Control)、模型组(H₂O₂)、游离木犀草素组(F-Lu)、木犀草素纳米制剂组(N-Lu)。给药组 24 h 后加入 2、5、10、20、40、50、100 μmol/L 浓度的 F-Lu 及 N-Lu。继续孵育 24 h 后各组加入 400 μmol/L H₂O₂ 溶液诱导 4 h, 对照组不做处理。每孔加入 20 μL 终浓度为 5 mg/mL 的 MTT 溶液, 培养 2~4 h, 弃去上清, 加入 150 μL DMSO 振荡 10 min, 待孔内紫色颗粒完全溶解后于 570 nm 波长处用酶标仪测取 OD 值, 计算细胞存活率^[12]。同时, 将 PC12 细胞接种于 6 孔板中, 按上述给药方式进行处理, 之后进行 β-actin 免疫荧光染色, 观察细胞的形态学变化^[13]。

利用 western-blot 检测 JNK、ERK 和 p38 MAPK 蛋白磷酸化水平。取上述各组细胞, BCA 法蛋白定量。经 SDS-PAGE 电泳分离后, 转移至 PVDF 膜上, PBST 漂洗, 4 °C 过夜孵育, 加入一抗和二抗, ECL 化学发光, 显影。

2.3 木犀草素纳米制剂对大鼠脑缺血再灌注损伤氧化应激水平的影响

根据文献^[14]所述方法建立大鼠右侧大脑缺血再灌注损伤模型。将健康雄性 SD 大鼠随机分为 4 组: 假手术组(Sham)、模型组(IR)、游离木犀草素组(F-Lu)、木犀草素纳米制剂组(N-Lu), 每组 20 只, F-Lu、N-Lu 组分别尾静脉给予木犀草素对照品、木犀草素纳米制剂(10 mg/kg), Sham 组和 IR 组均给予生理盐水。之后根据 Zea Longa 五分制法对大鼠神经功能损伤状态进行评分^[15]。24 h 后, 对大鼠进行股动脉取血, 5 000 rpm 离心 5 min 取上清, -20 °C 保存备用。血清样品按照试剂盒操作说明处理, 测定 SOD、MDA、GSH-Px 值。完整取出大鼠脑组织, 进行 TTC 染色并计算各组脑梗死体积。各组脑部

含水量通过以下公式计算:

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

2.4 木犀草素纳米制剂的药代动力学研究

2.4.1 工作液配制

木犀草素对照品溶液: 精密称取木犀草素对照品 29.11 mg 于 25 mL 量瓶中, 加甲醇溶液溶解并稀释至刻度, 摆匀, 得 1.16 mg/mL 的对照品溶液, 4 °C 保存备用。

内标溶液: 精密称取香叶木素对照品 20.07 mg 于 25 mL 的量瓶中, 加甲醇溶液溶解并稀释至刻度, 摆匀, 得 0.807 mg/mL 的内标溶液, 4 °C 保存备用。

2.4.2 给药方案及血样采集

将健康雄性 SD 大鼠随机分为 2 组, 分别尾静脉给予木犀草素对照品和木犀草素纳米制剂, 并于给药后 5、15、30 min, 1、2、4、6、8、10 h 采血, 5 000 rpm 离心 5 min 取上清, -20 °C 保存备用^[16]。

2.4.3 血浆样品的处理与测定

取 100 μL 大鼠血浆样品, 加入 10 μL 香叶木素溶液、10 μL 甲醇、100 μL HCl 溶液(10 mol/L)混匀, 在 80 °C 水浴 2 h, 冷却后加入 50 μL 10% 的三氯乙酸溶液, 涡旋混匀 3 min, 加入 2 mL 乙酸乙酯萃取, 涡旋混匀 3 min, 10 000 rpm 离心 10 min, 吸取上层乙酸乙酯层, N₂ 吹干, 100 μL 甲醇复溶, 12 000 rpm 离心 10 min, 取上清液, 4 °C 保存备用。

2.5 数据分析

采用 SPSS 17.0 对数据进行单因素方差分析, 以 $\bar{x} \pm s$ 表示, $P < 0.05$ 表示有显著性差异, 有统计学意义。

3 实验结果

3.1 木犀草素纳米制剂表征

木犀草素纳米制剂形态见图 1A, 载药胶束呈规则球形或椭圆形, 分布均匀, 彼此不粘连。如图 1B 所示, 粒径在 30 nm 左右。木犀草素纳米制剂的载药量和包封率实验结果如表 1 所示。投药量在 2%~5% 范围内, 包封率均保持在 95% 以上, 之后随着投药量不断增加, 包封率明显降低。

本实验采用投药量为 5% 的木犀草素纳米胶束进行体外释放研究。如图 2 所示, 从药物释放曲线中发现, F-Lu 在 24 h 内几乎完全从透析袋中释放出来。而 N-Lu 的药物累计释放量在相同时间内仅 58.7%, 这表明胶束可防止木犀草素在最初发生突释, 使其在体内的循环时间和生物利用度增加。

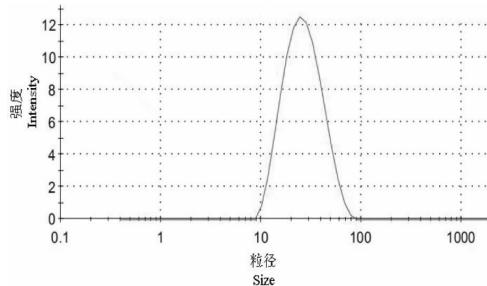
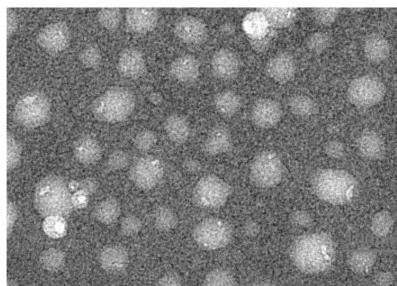


图 1 木犀草素纳米制剂表征

Fig. 1 Characterization of luteolin nano-formulation

注: A. 电镜图; B. 粒径分布。

Note: A. TEM image; B. Particle size distribution.

表 1 木犀草素纳米制剂载药量和包封率

Table 1 Drug loading and encapsulation efficiency of luteolin nano-formulation

投药量 Drug feeding (%)	载药量 Drug loading (%)	包封率 Encapsulation efficiency (%)
2	1.65 ± 0.21	99.23 ± 1.34
5	4.63 ± 0.13	97.40 ± 1.56
10	7.21 ± 0.15	86.34 ± 1.43
12	7.45 ± 0.12	72.30 ± 2.32

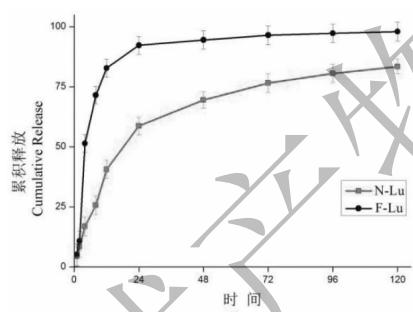


图 2 木犀草素纳米制剂体外释放曲线

Fig. 2 In vitro release curve of luteolin nano-formulation

3.2 木犀草素纳米制剂对 PC12 细胞氧化应激损伤的影响

细胞活性检测结果如图 3 所示。与 Control 组相比, H_2O_2 显著性降低了 PC12 细胞的存活率 ($P < 0.01$) ,当加入木犀草素预保护后, 在 $5 \sim 10 \mu\text{mol/L}$ 浓度范围内随着木犀草素浓度增高, 细胞存活率明显提高 ($> 85\%$)。此外, 与 F-Lu 组相比, N-Lu 组的细胞存活率显著提高 ($P < 0.05$)。随着木犀草素剂量的增加, PC12 细胞的存活率呈现下降趋势, 说明木犀草素对抗氧化应激作用具有剂量依存关系, $10 \mu\text{mol/L}$ 浓度左右, 其抗氧化应激作用最强。以上结

果表明, 木犀草素纳米制剂能够进一步减轻 PC12 细胞的氧化应激损伤。

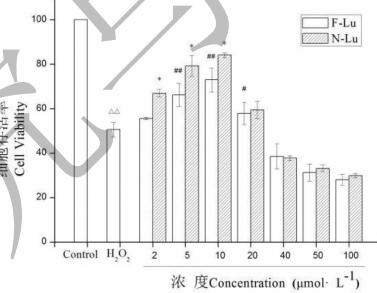
图 3 木犀草素纳米制剂对 H_2O_2 诱导 PC12 细胞存活率的影响 ($n = 6$)

Fig. 3 Effect of luteolin nano-formulation on

PC12 viabilities induced by H_2O_2 ($n = 6$)

注: $\triangle\triangle P < 0.01$: 与空白对照组相比; $\#\# P < 0.01$ 、 $\# P < 0.05$: 与 H_2O_2 组相比; $* P < 0.05$: 与游离木犀草素组相比。

Note: $\triangle\triangle P < 0.01$ vs Control; $\#\# P < 0.01$ 、 $\# P < 0.05$ vs H_2O_2 ;

$* P < 0.05$ vs F-Lu.

此外, 对各组 PC12 细胞的细胞骨架进行免疫荧光染色, 观察其形态学变化。如图 4 所示, 正常 PC12 细胞的骨架纹理清晰, 呈典型的密集网络状结构, 状态良好^[17]。而 Model 组相比 Control 组, 细胞边缘发生皱缩, 骨架纤维间隙变大, 有骨架断裂出现。实验组给药后细胞状态均有所恢复。相比 F-Lu 组, N-Lu 的细胞骨架清晰, 着色均匀, 细胞形态更为理想。结果表明, 木犀草素纳米制剂不仅能够提高氧化应激环境中细胞的生存率, 同时能够减轻由于氧化应激介导的细胞形态学改变。

MAPK 作为丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶家族的一员, 可以响应包括氧化应激在内的各种刺激, 调控着许多生理活动, 如炎症、凋亡等, 其三个主要成员为

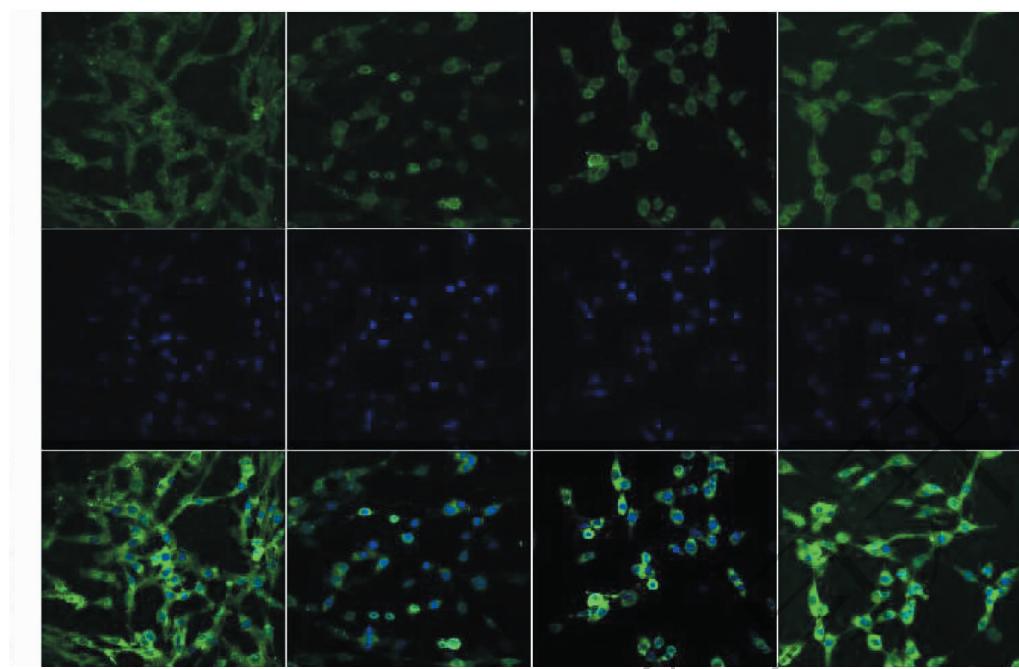


图 4 木犀草素纳米制剂对 PC12 细胞形态学的影响

Fig. 4 Effect of luteolin nano-formulation on the morphology change of PC12 cells

ERK1/2、JNK、p38 MAPK^[18]。因此采用 western-blot 检测各组 PC12 细胞中三个信号转导蛋白的磷酸化水平。结果如图 5 所示,与 F-Lu 组相比,N-Lu 组 p-JNK、p-p38、p-ERK1/2 表达水平显著降低($P <$

0.01)。表明木犀草素纳米制剂可通过抑制 JNK、p38、ERK1/2 磷酸化活性来减少细胞凋亡,显著提高抗氧化应激损伤水平。

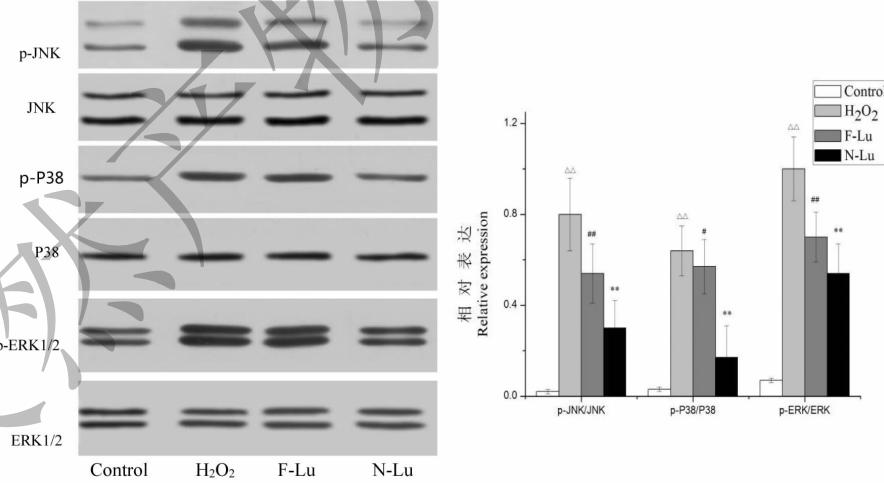


图 5 木犀草素纳米制剂对 PC12 细胞中 p-JNK, p-P38, p-ERK1/2 磷酸化水平的影响

Fig. 5 Effect of luteolin nano-formulation on phosphorylation of p-JNK, p-P38 and p-ERK1/2 in PC12 cells

注:△△ $P < 0.01$;与空白对照组相比;## $P < 0.01$, $*P < 0.05$;与 H₂O₂ 组相比;** $P < 0.01$;与游离木犀草素组相比。

Note: △△ $P < 0.01$ vs Control; ## $P < 0.01$, * $P < 0.05$ vs H₂O₂; ** $P < 0.01$ vs F-Lu.

3.3 木犀草素纳米制剂对大鼠脑缺血再灌注损伤的影响

大鼠脑梗染色结果如图 6 所示。同时脑梗死体

积及脑含水量的测定结果见表 2。与 Sham 组相比,IR 组的脑梗死体积和含水量均显著性增加($P < 0.05$),与 IR 组相比,给药之后脑梗死体积显著降低

($P < 0.01$), 相比 F-Lu 组, N-Lu 组脑梗死体积显著性减少, 具有差异性($P < 0.05$)。表明木犀草素纳米制剂能够有效减少缺血再灌注损伤导致的梗死体积。然而, 由于缺血再灌注损伤可引起 BBB 通透性显著增加, 造成神经细胞间质出现明显水肿, 因此含

水量的高低可间接表明 BBB 受损程度^[19]。如表 2 所示, 各手术组脑含水量均有所增加, 治疗组的含水量相比 IR 组有一定的降低, 但无显著性差异, 这可能是由于在短时间内, BBB 的通透性并未完全恢复导致的外源性物质向脑组织内流。

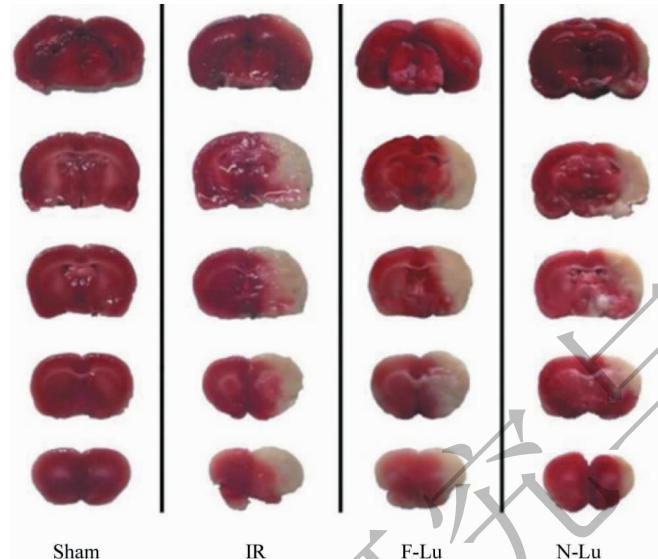


图 6 大鼠脑部 TTC 染色
Fig. 6 TTC staining of rats brain

表 2 木犀草素纳米制剂对大鼠脑梗死体积及脑含水量的影响($\bar{x} \pm s, n=6$)

Table 2 Effect of luteolin nano-formulation on cerebral infarction volume and brain water content in rats ($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别 Group	剂量 Dose (mg/kg)	脑梗死体积 Infarct volume (%)	脑含水量 Water content (%)
假手术组 Sham	-	-	80.61 ± 0.38
模型组 IR	-	$25.03 \pm 1.41^{\triangle\triangle}$	$81.90 \pm 0.25^{\triangle}$
游离木犀草素组 F-Lu	10	$22.98 \pm 1.64^{##}$	81.72 ± 0.57
木犀草素纳米制剂组 N-Lu	10	$17.25 \pm 0.77^*$	81.34 ± 0.41

注: $^{\triangle\triangle} P < 0.01$ 、 $^{\triangle} P < 0.05$; 与假手术组相比; $^{##} P < 0.01$; 与模型组相比; $^* P < 0.05$; 与游离木犀草素组相比。

Note: $^{\triangle\triangle} P < 0.01$ 、 $^{\triangle} P < 0.05$ vs Sham; $^{##} P < 0.01$ vs IR; $^* P < 0.05$ vs F-Lu.

3.4 木犀草素纳米制剂体内抗氧化损伤作用机制研究

抗脑缺血再灌注损伤体内实验表明, 木犀草素纳米制剂能够显著性降低 IR 损伤, 其体内作用机制研究结果如表 3 所示。SOD 及 GSH-Px 是机体内重要的抗氧化物质, 能够直接清除自由基, 保护机体免受氧化应激损伤。因此, SOD 及 GSH-Px 含量的高低直接反映了体内抗氧化作用的强弱。同时, MDA 的含量可用于直接反应组织受氧化损伤的程度。结果显示, 与 Sham 组相比, IR 组血样中 SOD、GSH-Px 含量显著降低($P < 0.01$), MDA 含量显著升高($P <$

0.01)。与 IR 组相比, 给药组氧化应激损伤水平显著改善。相比 F-Lu 组, N-Lu 组 SOD、GSH-Px 水平升高, MDA 含量明显降低, 具有显著性差异($P < 0.01$)。

3.5 木犀草素纳米制剂的药代动力学研究

经尾静脉注射, 分别给予 SD 大鼠 F-Lu 和 N-Lu (10 mg/kg, 木犀草素量计), 在设定时间点进行样品采集和测定, 计算各时间点血药浓度, 绘制血药浓度-时间曲线如图 7 所示。同时, 经 DAS 软件自动拟合数据, 计算相关药代动力学参数见表 4。结果显示, 对比 F-Lu 组, N-Lu 组的峰浓度提高, 半衰期延长, 药时曲线下面积明显增大。

表 3 木犀草素纳米制剂对大鼠血样中 SOD、MDA、GSH-Px 的影响($\bar{x} \pm s, n=6$)
Table 3 Effect of luteolin nano-formulation on SOD、MDA、GSH-Px in rat blood samples($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别 Group	剂量 Dose (mg · kg ⁻¹)	SOD (U · mL ⁻¹)	MDA (nmol · mL ⁻¹)	GSH-Px (U · mL ⁻¹)
假手术组 Sham	-	454.23 ± 38.49	5.29 ± 0.2	1 582.22 ± 227.86
模型组 IR	-	125.53 ± 24.44 ^{△△}	10.92 ± 4.31 ^{△△}	1 255.11 ± 236.68 ^{△△}
游离木犀草素组 F-Lu	10	280.80 ± 7.57 [#]	7.24 ± 0.34 ^{##}	1 336.89 ± 95.6 [#]
木犀草素纳米制剂组 N-Lu	10	341.91 ± 61.90 ^{* *}	6.55 ± 0.34 ^{* *}	1 447.11 ± 102.50 ^{* *}

注: ^{△△} $P < 0.01$; 与假手术组相比; ^{##} $P < 0.01$; [#] $P < 0.05$; 与模型组相比; ^{* *} $P < 0.01$; 与游离木犀草素组相比。

Note: ^{△△} $P < 0.01$ vs Sham; ^{##} $P < 0.01$; [#] $P < 0.05$ vs IR; ^{* *} $P < 0.01$ vs F-Lu.

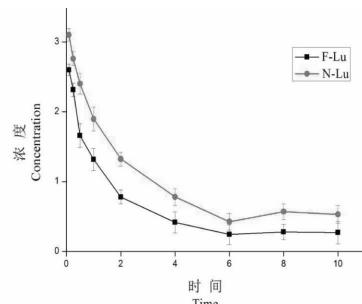


图 7 大鼠体内平均血药浓度-时间曲线

Fig. 7 Mean plasma concentration-time curve in rats

表 4 木犀草素纳米制剂药动学参数($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 4 Pharmacokinetic parameters of luteolin nano-formulation($\bar{x} \pm s, n=3$)

参数 Parameter	F-Lu	N-Lu
$t_{1/2}$ (hr)	3.1	3.9
C_{max} ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	2.6 ± 0.13	3.1 ± 0.11
$AUC_{0-\infty}$ ($\text{hr} \cdot \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	5.9 ± 0.19	9.5 ± 0.10 ^{* *}
MRT (hr)	2.9 ± 0.11	3.4 ± 0.09
CL_{obs} ($\text{hr} \cdot \text{mL} \cdot \text{kg}^{-1}$)	2 809.4 ± 0.07	1 609.4 ± 0.05
$V_{ss, obs}$ ($\text{mL} \cdot \text{kg}^{-1}$)	13 725.2 ± 0.03	10 065.0 ± 0.03

注: ^{* *} $P < 0.01$; 与游离木犀草素组相比。

Note: ^{* *} $P < 0.01$ vs F-Lu.

4 讨论

目前临床使用的木犀草素口服剂型存在生物利用度低、血药浓度达峰时间长等不足,极大地限制了其推广应用;不仅如此,由于木犀草素在水中的低溶解性,给开发其静脉剂型也带来了很大的困难^[20]。本文中,使用了泊洛沙姆包裹木犀草素,制备成纳米胶束制剂,有效地改善了疏水药物木犀草素在水溶液中的分散性,突破了其在静注给药中的使用限制。不仅如此,在制备过程中不含有机溶剂,避免了传统输水药物静脉制剂(如泰素帝等)中有机溶剂残留所引起的毒副反应。此外,本研究中所制备的木犀草素纳米制剂具有粒径分布均一、载药性能较高等

特点,可改善木犀草素自身的成药性缺陷,提高了木犀草素的临床使用价值及应用前景。

肌动蛋白是构成细胞骨架的主要成分,其与细胞形态变化密切相关,而细胞形态学的变化可直接反应出细胞的状态。有研究显示,细胞凋亡过程中肌动蛋白丝发生断裂,骨架结构遭到破坏^[21]。体外 H_2O_2 诱导 PC12 细胞氧化应激损伤结果表明木犀草素纳米制剂不仅显著性提高了 PC12 细胞的存活率,而且能够进一步保持细胞结构的完整性,通过抑制 JNK、p38、ERK 磷酸化水平从而减少由于氧化应激损伤所造成的细胞凋亡。

ROS 能够使细胞膜上的脂类氧化,之后降解形成毒性产物丙二醛(MDA)^[22]。超氧化物歧化酶(SOD)是机体内清除氧自由基的特异性酶,它可以歧化 O_2^- 生成 H_2O_2 ,继而被谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)清除^[23]。由于氧化应激是造成脑缺血再灌注损伤的主要因素,因此在本实验中,采用大鼠右侧大脑缺血再灌注损伤模型对木犀草素的体内抗氧化应激损伤作用进行评价。实验结果表明,木犀草素纳米制剂能够通过降低药物在体内的清除率,延长药物作用时间来显著性降低大鼠脑梗死体积,提高体内 SOD、GSH-Px 含量,降低 MDA 水平。有效地发挥了天然药物木犀草素的体内抗氧化应激作用,明显改善了脑缺血再灌注损伤。

综上所述,木犀草素纳米制剂改善了木犀草素单体的成药性缺陷,增强了体内外抗氧化应激作用,同时有效地改善了脑缺血再灌注损伤,为缺血性脑损伤的治疗研究提供了新的思路,具有潜在的临床应用前景。

参考文献

- Wang Z, Huang YM, Peng J. Oxidative stress and cerebral ischemia-reperfusion injury[J]. Int J Pathol Clin Med(国际病理科学与临床杂志), 2012, 32:343-346.

(下转第 778 页)