

网络出版时间:2025-02-06 14:25:14 网络出版地址:https://link.cnki.net/urlid/34.1065.R.20250206.1136.003

大蒜新素纳米缓释颗粒的制备及其对下肢缺血保护作用的实验研究

欧阳欢¹,刘博^{1,2},刘逸^{1,2},查斌山¹,丁洋¹,胡先宇¹,陈智勇¹

(¹安徽医科大学第一附属医院普外科,合肥 230022;²安徽医科大学第一临床学院,合肥 230032)

摘要 目的 制备负载大蒜新素——二烯丙基三硫化物(DATS)的中空介孔硅纳米微球(HMSNs),并研究其作为下肢缺血性损伤治疗剂的可行性。方法 采用选择性蚀刻法合成出HMSNs,同时利用扫描和透射电镜观察微观结构,X射线衍射和动态光散射(DLS)分析理化性质,红细胞溶血实验和细胞毒性实验测试生物安全性。采用吸附法将DATS负载至HMSNs里,获得缓释DATS的纳米颗粒(DATS-HMSNs),并用紫外分光光度法计算并制作DATS的累积释放曲线。将C57BL/6小鼠随机分为四组(假手术组、0.9%氯化钠注射液组、DATS组、DATS-HMSNs组),下肢缺血模型采用股动脉结扎切除法制作。测试各组小鼠肢体缺血前后的运动能力和肌肉内肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白细胞介素-6(IL-6)、单核细胞趋化蛋白-1(MCP-1)、活性氧(ROS)、血小板内皮细胞黏附分子(CD31)、 α -平滑肌肌动蛋白(α -SMA)、碱性成纤维细胞生长因子(bFGF)和血管内皮生长因子(VEGF)含量的变化。结果 扫描和透射电镜观察可见制备出的HMSNs为中空的球形且粒径均一,DLS结果显示粒径为(226.5 \pm 11.8)nm。红细胞溶血实验及细胞毒性实验结果表明HMSNs具备良好的生物相容性。HMSNs对DATS的最大载药率为27.89%,7dDATS的累积释放率80.12%,21d可达到97.27%。与对照组比较,DATS-HMSNs用于下肢缺血小鼠后,免疫组化染色发现CD31、 α -SMA、bFGF及VEGF的水平增高($P < 0.05$),ELISA实验发现TNF- α 、IL-6、MCP-1和ROS的含量减低($P < 0.05$),并且缺血后小鼠运动能力恢复满意。结论 DATS-HMSNs可以缓慢、持续地释放DATS,为下肢缺血性损伤提供保护作用。

关键词 大蒜新素;二烯丙基三硫化物;中空介孔硅;下肢缺血;硫化氢;纳米载药系统

中图分类号 R 654.4

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2025)02-0201-09

doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2025.02.003

下肢缺血是指任何病因所致血供减少引起的肢体远端缺血症状,重者危及肢体存活。持续性缺血诱发过度氧化应激和强烈炎症反应,会妨碍血管新生进而影响血供改善^[1]。近年来多项研究表明^[2-4],二烯丙基三硫化物(diallyl trisulfide,DATS)即大蒜新素可以减轻氧化应激、抑制炎症反应、促进血管新生。常规条件下DATS是液态油状物,虽拥有良好透膜性,却极难溶于水,这导致其生物利用度差,限制了其临床应用^[5]。因此,提高溶解度和生物利用度是其应用中亟待解决的关键问题。纳米缓释技术是一种新兴的药物释放技术,它可以调控药物释放速率,实现药物疗效的提高和毒副作用的降低^[6]。中空介孔硅纳米微球(hollow mesoporous silicon nanoparticles,HMSNs)作为药物载体,因其比表

面积大、载药率高和可控释放等优点,引起了广泛关注^[7]。因此,该研究利用HMSNs为载体,负载DATS,制备出缓释DATS的纳米颗粒(DATS-HMSNs),并在动物实验中探讨DATS-HMSNs对下肢缺血性损伤的保护作用。

1 材料与方法

1.1 主要试剂与仪器 二甲基亚砜(货号:D806645,上海麦克林生化科技有限公司);氨水(货号:10002108,上海国药集团化学试剂有限公司);DATS(货号:D302734)、正硅酸四乙酯(货号:S283291)、十六烷基三甲基溴化铵(货号:H432954)、三乙醇胺(货号:T108154)、环己烷(货号:C100587)、无水碳酸钠(货号:S141342)和盐酸乙醇分化液(货号:A743394)均购于上海阿拉丁生化科技有限公司;人脐静脉内皮细胞(货号:MZ-301950,宁波明舟生物科技有限公司);组织提取液(货号:15596026CN,美国Invitrogen公司);蛋白酶和磷酸酶抑制剂混合物(货号:PPC1010,德国Sigma-Aldrich公司);胎牛血清(货号:A5256701,美国

2024-09-29 接收

基金项目:安徽省高等学校自然科学研究项目(编号:KJ2020A0195)

作者简介:欧阳欢,男,主治医师;

陈智勇,男,副主任医师,硕士生导师,通信作者,E-mail:

ayczy@163.com

Gibco 公司); CCK-8 试剂盒(货号: CA1210, 北京索莱宝科技有限公司); 小鼠肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor alpha, TNF- α) 酶联免疫分析 (enzyme-linked immunoassay, ELISA) 试剂盒(货号: SBJ-M0030-96T)、小鼠白细胞介素-6 (interleukin-6, IL-6) ELISA 试剂盒(货号: SBJ-M0044) 和小鼠活性氧 (reactive oxygen species, ROS) ELISA 试剂盒(货号: SBJ-M0608) 均购于南京森贝伽生物科技有限公司; 小鼠单核细胞趋化蛋白 1 (monocyte chemoattractant protein-1, MCP-1) ELISA 试剂盒(货号: RJ16929, 上海仁捷生物科技有限公司); 多功能酶标仪(型号: VICTOR Nivo, 美国 PerkinElmer 公司); 真空冷冻干燥机(型号: TG16-WS, 北京松源华兴科技有限公司); CO_2 恒温培养箱(型号: Discovery TGA55612-1, 四川医用设备有限公司); 紫外可见分光光度计(型号: JS-186, 日本岛津公司); 超声波细胞破碎仪(型号: JY92-IIN, 浙江赛德仪器设备有限公司); 扫描电子显微镜(型号: 西格玛-300, 德国蔡司公司); 透射电子显微镜(型号: Inspect F50, 美国赛默飞公司); 动态光散射粒度分析仪(型号: Nicomp 380, 美国 PSS 粒度仪公司); 吸入式气体麻醉机(型号: RWD510, 深圳瑞沃德生命科技有限公司); 光学显微镜(型号: BX43F, 日本 OLYMPUS 公司)。

1.2 实验动物 SPF 级 C57BL/6 雌性小鼠 60 只, 8 周龄, 体质量 (20.32 ± 1.00) g, 购于常州卡文斯实验动物有限公司[动物生产许可证号: SCXK(苏)2021-0013]。饲养环境: 温度 $20 \sim 25$ $^{\circ}\text{C}$; 相对湿度 $(55.2 \pm 5.0)\%$; 昼夜节律分别为 12 h; 每笼 6 只进行分组, 分笼进行饲养; 自由饮食、饮水。严格遵守安徽医科大学动物伦理要求进行动物的操作和处理, 伦理批号: LLSC20201017。

1.3 方法

1.3.1 DATS-HMSNs 的合成与表征 HMSNs 的合成^[3]: ① 量取 4 ml 氨水、178.5 ml 无水乙醇和 25 ml 超纯水, 室温下混合搅拌 30 min (300 r/min), 然后缓慢滴加正硅酸四乙酯 5 ml 并持续搅拌 1 h; ② 将获得的混合溶液高速离心 (8 500 r/min) 15 min, 弃去上清液后将得到的沉淀物再分散到 100 ml 超纯水中; ③ 分别将 30 g 十六烷基三甲基溴化铵和 0.9 ml 三乙醇胺溶于 200 ml 超纯水混匀后再倒入上一步得到的混合溶液, 转移至圆底烧瓶里搅拌混匀, 再缓慢滴入 10 ml 正硅酸四乙酯和 90 ml 环己烷的混合液, 再将圆底烧瓶置于 60 $^{\circ}\text{C}$ 的水浴锅里缓慢搅拌 6 h, 然后收集下层乳白色透亮的水相溶液; ④ 用超

纯水将上一步得到的水相溶液稀释并定容到 360 ml, 添加 7.638 g 纯碱后持续剧烈搅拌 1 h, 12 000 r/min 高速离心 30 min 后, 水洗干净后再用盐酸乙醇分化液反复超声萃取多次, 直到沉淀物易超声分散, 水洗离心去除杂质, 最终得到 HMSNs, 将其真空冷冻干燥 24 h 后, 收集白色冻干粉用于后续实验。

采用吸附法将 DATS 负载至 HMSNs 里: 取一定量的 DATS 溶于二甲基亚砜, 与 HMSNs 按照 1:1 的比例混合, 室温下搅拌吸附 12 h, 达到平衡后离心, 移去上清液, 真空状态下挥去溶剂, 最终得到载药样品 (DATS-HMSNs) 粉末。

材料的表征: 扫描电子显微镜 (scanning electron microscope, SEM) 观察 HMSNs 的外貌形态和粒径大小; 电子透射显微镜 (transmission electron microscopy, TEM) 观察 HMSNs 的内在形态和孔道结构; X 射线衍射 (X-ray diffraction, XRD) 进行结构分析; 动态光散射 (dynamic light scattering, DLS) 测定 HMSNs 电势和粒径大小; 用紫外-可见分光光度法分析 DATS-HMSNs 的载药率和 DATS 的累积药物释放率, 其中载药率 (%) = $(\text{投药量} - C_{\text{上清液}} V) / (\text{投药量} - C_{\text{上清液}} V + W_{\text{载体量}}) \times 100\%$ 。

1.3.2 溶血实验 新鲜正常人全血由安徽医科大学第一附属医院提供。首先, 取 3 ml 的新鲜抗凝全血以 1 500 r/min 转速离心 15 min。离心后弃上清液, 保留红细胞沉淀。吸取 1 ml 红细胞稀释于 3.67 ml 0.9% 氯化钠注射液, 制成红细胞悬液。然后, 准确称取 HMSNs, 用 0.9% 氯化钠注射液分别配置成 50、100、200、400 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的混悬液。实验组: 1 ml 的 0.9% 氯化钠注射液和 100 μl 红细胞悬液分别与 100 μl 不同浓度的 HMSNs 混悬液混合均匀。阳性对照组: 1.1 ml 的去离子水和 100 μl 红细胞悬液。阴性对照组: 1.1 ml 的 0.9% 氯化钠注射液和 100 μl 红细胞悬液。所有样品均 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 2 h 后取出离心 (1 500 r/min, 15 min), 再从所有样品中分别吸出 100 μl 上清液置于 96 孔板内, 每组 3 个复孔, 使用多功能酶标仪读取波长 540 nm 处的光密度 (optical density, OD) 值, 并按照公式计算红细胞溶血率。溶血率 (%) = $(\text{OD}_{\text{实验}} - \text{OD}_{\text{阴性}}) / (\text{OD}_{\text{阳性}} - \text{OD}_{\text{阴性}}) \times 100\%$ 。

1.3.3 细胞毒性实验 接种人脐静脉内皮细胞于 96 孔板, 密度为每孔 5.0×10^3 个, 实验组细胞用不同浓度的 HMSNs 混悬液 (0、50、100、200、400 $\mu\text{g}/\text{ml}$) 处理, 孵育 24 h 后加入 CCK-8 溶液 10 $\mu\text{l}/\text{孔}$, 继

续孵育 1 h 后,用多功能酶标仪读取波长 450 nm 处各孔的 OD 值,计算细胞存活率。 $0 \mu\text{g/ml}$ 组的细胞存活率拟设为 100%。细胞存活率 = $(\text{OD}_a - \text{OD}_b) / (\text{OD}_c - \text{OD}_b) \times 100\%$, 其中, OD_a 为不同浓度 HMSNs 组的 OD 值, OD_b 为空白处的 OD 值, OD_c 为 $0 \mu\text{g/ml}$ 组 OD 值。

1.3.4 小鼠后肢缺血模型 结扎切除法:使用 2% 异氟烷麻醉小鼠,氧气流量稳定为 2 L/min。对左腹股沟及后肢进行剃毛和消毒,采取后肢内侧切口,暴露后肢动脉,分离股动脉和股静脉,在股动脉近端和远端分别进行双线结扎,之后剪断两结扎点之间的股动脉,然后逐层缝合皮肤,最后用碘伏擦拭伤口处。手术结束后,将动物置于 37 °C 的孵箱内直到苏醒。小鼠复苏后,转致饲养笼中培养,并在笼底部添加部分软化的食物和水,以方便手术后的小鼠摄食。

1.3.5 实验分组方案 将造模成功的 C57BL/6 雌性小鼠随机分为 4 组(每组 12 只):假手术组(只切开小鼠皮肤,不做血管结扎切除)、0.9% 氯化钠注射液组(生理盐水组)、DATS 组、DATS-HMSNs 组。采用腹腔注射的方式进行给药。在小鼠股动脉结扎手术前 1 d 给予假手术组 1 ml 0.9% 氯化钠注射液,生理盐水组给予 1 ml 0.9% 氯化钠注射液, DATS-HMSNs 组给予 1 ml DATS-HMSNs 混悬液, DATS 组给予按照载药率换算出的 1 ml DATS 混悬液。在缺血第 21 天后进行运动能力测试,并取材进行形态学检测。

1.3.6 小鼠运动能力测试 适应性训练:实验前 1 周,设置跑台坡度为 7°,让小鼠进行适应性训练,先适应环境 5 min 后,跑台逐渐加速至 10 m/min,维持该速度,5 min 后逐渐加速至 15 m/min 并再维持 5 min,然后逐渐降速至停止,最后,将小鼠取出放回饲养笼内。

运动能力测试:每组随机取出 5 只小鼠,轻轻放入跑台的跑道中,然后逐渐加速,3 min 内加速到 12.5 m/min,视为运动能力检测开始。然后,逐渐提高跑台速度,在 5 min 内加速到 15 m/min。随后,以每 3 min 增加 2.5 m/min 的速度逐渐提速,直到小鼠不能维持所需的运动速度(使用毛刷或电击连续 3 次,小鼠不能持续向前跑动),才将其从跑台拿出放入新的小鼠饲养笼中继续饲养。记录小鼠的最大速度、运动时间及运动距离,以评价其运动能力。

1.3.7 动物样本获取与处理 小鼠运动能力测试结束后每组剩余的小鼠全部使用 2% 异氟烷麻醉,75% 乙醇消毒表面,特别是要取材部位。然后,在小

腿朝向腹股沟一侧剪开一个纵向的切口,暴露出腿部骨骼肌,用眼科剪沿着肌丝走形剪取长条状肌肉,漂洗干净后切成 1 mm^3 小块,并分成两份,一份液氮急速冷冻后 $-80 \text{ }^\circ\text{C}$ 冰箱保存待用,另一份置于 4% 多聚甲醛中固定后,用石蜡包埋切片。

1.3.8 组织学染色与免疫组织化学染色 石蜡切片脱蜡水化后,按常规方法进行 HE 染色和 Masson 染色,使用正置显微镜分别拍照并保存。利用免疫组织化学染色法检测血小板内皮细胞黏附分子(clusters of differentiation-31, CD31)、 α -平滑肌肌动蛋白(alpha smooth muscle actin, α -SMA)、碱性成纤维细胞生长因子(basic fibroblast growth factor, bFGF) 和血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF) 等蛋白的表达情况,用光学显微镜拍照、留存,并采用 Image J 软件评估免疫反应阳性表达面积百分比。

1.3.9 骨骼肌组织蛋白提取及 ELISA 实验 将组织提取液从 $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ 冰箱取出后置于 $4 \text{ }^\circ\text{C}$ 冰箱内过夜解冻,再每组吸取 10 ml 分装于新的 15 ml 离心管,并在该离心管中加入 100 μl 蛋白酶抑制剂混合液。取 1 g 新鲜冰冻的骨骼肌组织迅速放入装有组织提取液的离心管内,并将离心管置于冰浴中。将机械匀浆器打开,转速设置为 5 000 r/min,然后将转头插入装有组织块的离心管中进行匀浆操作,直到骨骼肌组织完全打碎。匀浆结束后,将离心管放入冷冻离心机中离心($4 \text{ }^\circ\text{C}$, 10 000 r/min, 10 min),分离上清液至新的离心管, $-80 \text{ }^\circ\text{C}$ 冰箱保存待测。按照 ELISA 试剂盒说明书检测 TNF- α 、IL-6、MCP-1 和 ROS 的含量。测定 450 nm 处 OD 值,通过标准曲线计算样品中 TNF- α 、IL-6、MCP-1 和 ROS 的含量。

1.4 统计学处理 采用 SPSS 26.0 软件进行统计分析。符合正态分布的定量资料以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,两组间数据比较采用 *t* 检验,多组间比较采用单因素方差分析。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 材料的合成与表征 利用 SEM 和 TEM 对 HMSNs 的形貌和内在结构进行表征,SEM 图可见 HMSNs 是大小均一、表面多孔的球形纳米颗粒(图 1A),TEM 图显示 HMSNs 内部是空腔结构,外层壳的厚度适宜,并且外层壳上布满孔道(图 1B)。DLS 测得的 HMSNs 粒径为 $(226.5 \pm 11.8) \text{ nm}$ (图 1C)。XRD 对 HMSNs 粉末进行分析显示 HMSNs 在 2θ 为

23°时有1个明显的衍射峰(图1D),证明 HMSNs 有明显示序的介孔结构,这也进一步表明 HMSNs 的成功合成。再进行 HMSNs 对 DATS 的负载与表征。首先,图2A展示的以 DATS 浓度对紫外吸光度值进行线性回归,得到 DATS 的标准曲线, R^2 为 0.991,证明在此浓度范围内 DATS 浓度与吸光度值具有良好的线性关系。利用这个标准曲线,测出 DATS 与 HMSNs 的质量比为 0.8 : 1.0 时,具有最佳载药率,最大载药率为 27.89%。图2B展示了 DATS-HMSNs 在 37 °C 水浴,pH 值为 7.4 的 PBS 溶液里测得 DATS 累积释放率与时间的关系,第 1 ~ 7 天 DATS 快速释放,到第 7 天时 DATS 的累积释放率 80.12%,7 d 以后 DATS 释放速度减缓,至 21 时累积释放率已达到 97.27%。图3A展示的是 HMSNs、DATS 及 DATS-HMSNs 的表面 Zeta 电位变化,经测算它们的 Zeta 电位分别是 (-9.41 ± 0.66) 、 (-6.52 ± 0.40) 、 (-7.20 ± 0.44) mV。这种表面 Zeta 电位的变化说明 HMSNs 成功负载了 DATS。

2.2 生物相容性评估 理想的药物载体应该具有优异的生物相容性,为了评估 HMSNs 的生物相容

性,本研究分别进行了溶血实验和细胞毒性实验。图3B展示的是溶血实验结果表明当 HMSNs 与红细胞共培养时,HMSNs 最高浓度达到 400 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 时未观察到明显的溶血现象(红细胞溶血率 $< 5\%$)。当浓度高达到 400 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的 HMSNs 与人脐静脉内皮细胞共培养 3 d 后细胞的活力仍然 $> 90\%$ (图3C)。以上 2 个实验的结果都表明 HMSNs 对细胞几乎是无毒的,这反应出 HMSNs 具有良好的生物相容性。

2.3 小鼠运动能力测试 为了探究生理状态下血流灌注恢复情况,对小鼠缺血手术前和缺血手术后 21 d 的运动能力进行了检测。结果发现,在缺血手术前正常状态下,各组小鼠在坡度跑台上达到的最大速度、达到最大速度的时间和距离比较差异均无统计学意义($P > 0.05$),提示在非缺血状态下小鼠运动能力无明显差异。在缺血第 21 天后,假手术组小鼠在坡度跑台上达到的最大速度、达到最大速度的时间和距离与 DATS-HMSNs 组比较均差异无统计学意义($P > 0.05$)。相同的结果也见于生理盐水组与 DATS 组之间的比较。相应的,假手术组与

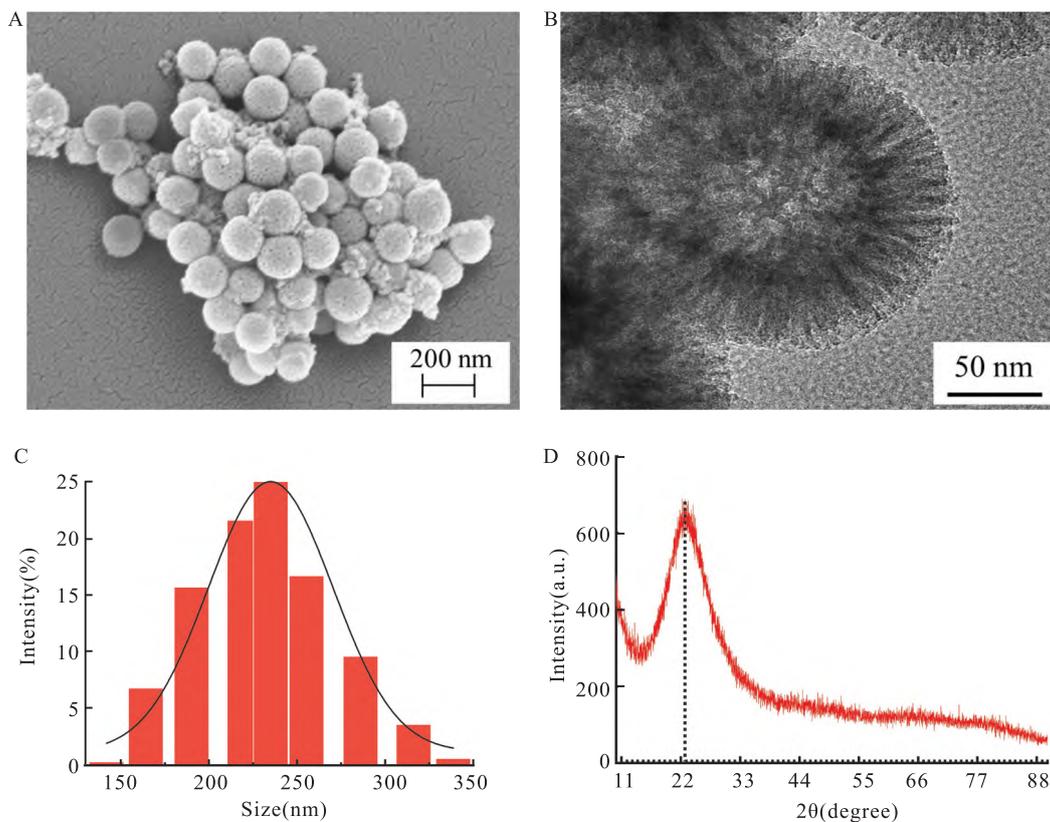


图1 HMSNs 的表征

Fig.1 Characterization of HMSNs

A: SEM; B: TEM; C: Particle size distribution; D: XRD.

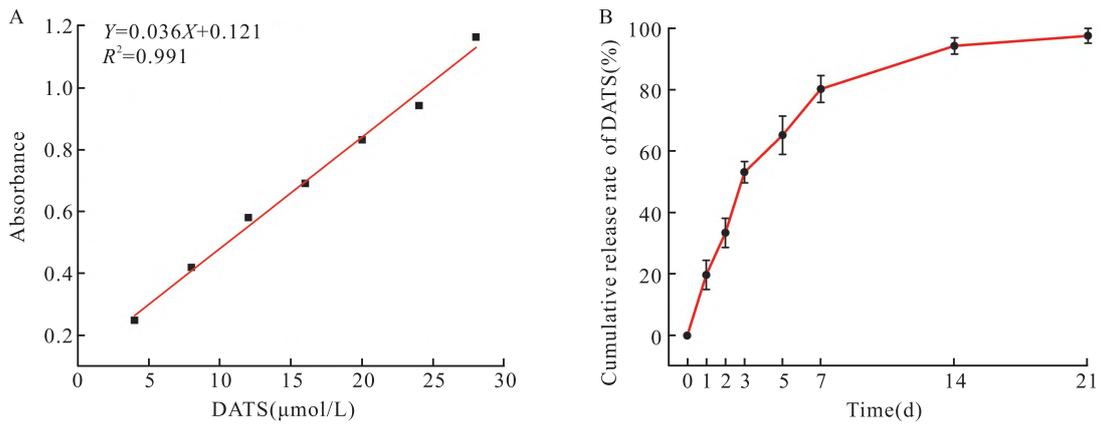


图2 DATS 的标准曲线和药物释放曲线

Fig.2 Standard curve and drug release curve for DATS

A: Standard curve of DATS measured by ultraviolet spectrophotometry; B: Cumulative release rate of DATS released by DATS-HMSNs.

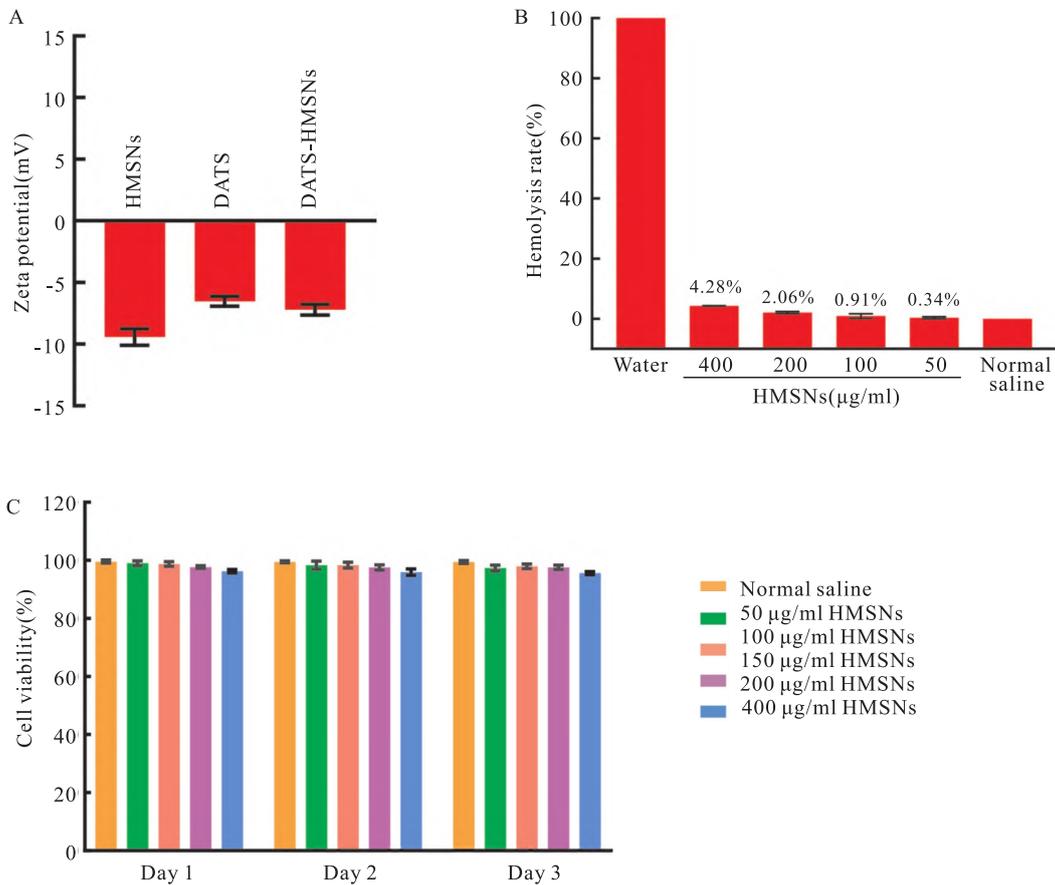


图3 材料的 Zeta 电位及生物安全性

Fig.3 Zeta potential and biological safety of materials

A: Zeta potential; B: The hemolysis rate of erythrocyte in different solutions; C: The cell viability of human umbilical vein endothelial cells in different concentration of HMSNs.

DATS 组或生理盐水组比较, DATS-HMSNs 组与 DATS 组或生理盐水组比较,小鼠在坡度跑台上达到的最大速度、达到最大速度的时间和距离均差异

有统计学意义 ($P < 0.05$)。这个结果说明,小鼠后肢缺血模型造模是成功的,并且缓慢释放 DATS 的 DATS-HMSNs 可以很好地改善小鼠肢体缺血后运动

能力的恢复。然而,并未观察到 DATS 爆发式给药对缺血后小鼠运动能力的保护作用。见图 4。

2.4 组织病理染色结果 组织学染色技术可以用来评估肌肉退变和组织炎症等形态学特征以及缺血区域的组织纤维化水平。如图 5 所示,HE 染色可见 DATS-HMSNs 组与假手术组的肌间隙宽度、肌横纹结构稳定,相较于生理盐水组和 DTAS 组的肌肉细胞变性和炎症细胞浸润均减弱。Masson 染色可使纤维组织呈蓝色,结果见 DATS-HMSNs 组的纤维化程度明显减轻,表明缓慢释放 DTAS 可显著减少胶原沉积,避免组织纤维化,从而减轻缺血对肌肉组织再生的影响。为了探究这个现象的深层次原因,再利用免疫组织化学染色技术检测肌肉组织内 CD31、 α -SMA、bFGF、VEGF 水平。与假手术组比较,生理盐水组的 CD31、 α -SMA、bFGF 及 VEGF 的

表达都不同程度升高($P < 0.05$);与生理盐水组比较,DATS 组 CD31、 α -SMA、bFGF 及 VEGF 的表达升高($P < 0.05$);与 DATS 组比较,DTAS-HMSNs 组 CD31、 α -SMA、bFGF 及 VEGF 的表达也升高($P < 0.05$),见图 6 和表 1。

2.5 各组肌肉内炎症因子及 ROS 水平的变化 缺血第 21 天后各组小鼠肌肉内炎症因子表达的结果见表 2。与假手术组比较,DATS-HMSNs 组 TNF- α 、IL-6 和 MCP-1 的表达水平升高,差异有统计学意义($P < 0.05$)。DTAS 组的 3 种炎症因子的表达水平高于 DATS-HMSNs 组,而生理盐水组的 3 种炎症因子表达水平又高于 DATS 组,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。各组小鼠缺血术前与术后第 21 天肌肉内 ROS 的浓度变化结果见图 7。术前各组的 ROS 浓度比较差异无统计学意义。术后 21 天假手术组

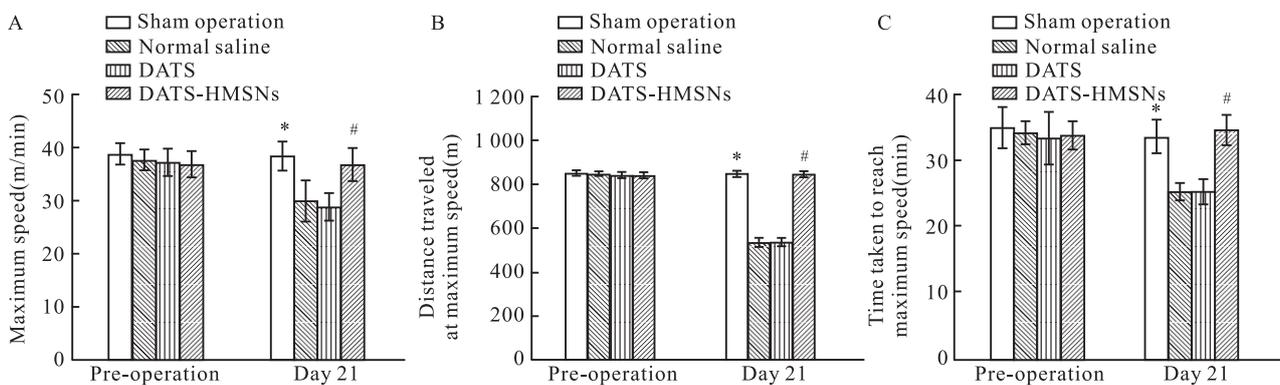


图 4 小鼠运动能力测试结果

Fig. 4 The exercise ability test results of Mice

A: Maximum speed achieved by mice on the treadmill before and 21 days after ischemic surgery; B: Distance traveled by mice at maximum speed on the treadmill before and 21 days after ischemic surgery; C: Time taken by mice to reach maximum speed on the treadmill before and on day 21 after ischemic surgery; # $P < 0.05$ vs DATS group; * $P < 0.05$ vs Normal saline group.

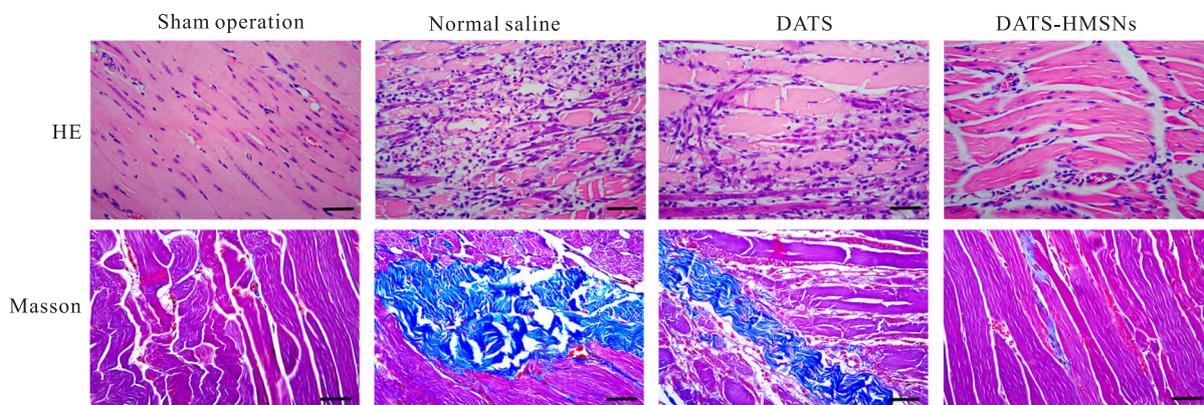


图 5 各组腓肠肌的 HE 和 Masson 染色结果 $\times 400$

Fig. 5 HE and Masson staining results of gastrocnemius muscles in each group $\times 400$

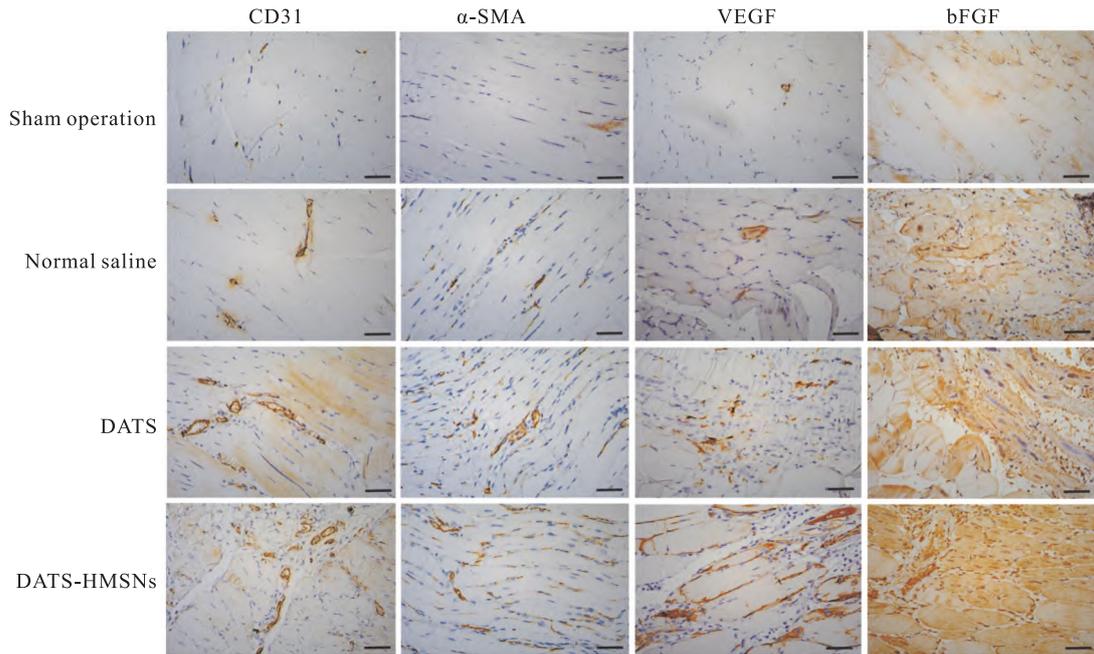


图6 各组小鼠腓肠肌的 CD31、α-SMA、bFGF 及 VEGF 的免疫组织化学染色结果 ×400

Fig.6 Immunohistochemical staining results of CD31, α-SMA, bFGF and VEGF in gastrocnemius muscles of mice in each group ×400

表1 Image J 软件分析的免疫反应阳性表达面积百分比 (n=7, x̄±s)

Tab.1 Percentage of positive expression area for immune reaction analyzed by Image J software (n=7, x̄±s)

Groups	CD31 (%)	α-SMA (%)	VEGF (%)	bFGF (%)
Sham operation	0.08 ± 0.04	0.06 ± 0.03	0.09 ± 0.04	0.94 ± 0.24
Normal saline	0.42 ± 0.10 *	0.32 ± 0.08 *	0.64 ± 0.07 *	3.81 ± 0.73 *
DATS	0.77 ± 0.07 #	0.59 ± 0.14 #	1.16 ± 0.13 #	5.70 ± 0.65 #
DATS-HMSNs	1.31 ± 0.09 §	1.24 ± 0.08 §	3.66 ± 0.37 §	9.65 ± 0.62 §
F value	548.11	268.21	433.36	470.40
P value	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

* P < 0.05 vs Sham operation group; # P < 0.05 vs Normal saline group; § P < 0.05 vs DATS group.

的 ROS 浓度最低, DATS-HMSNs 组的 ROS 浓度稍高于假手术组, 而 DATS 组的 ROS 浓度高于 DATS-HMSNs 组, 生理盐水组的 ROS 稍高于 DATS 组, 差异均有统计学意义的 (P < 0.05)。

表2 各组小鼠腓肠肌内 TNF-α、IL-6、MCP-1 含量 (pg/g, n=7, x̄±s)

Tab.2 Contents of TNF-α, IL-6, and MCP-1 in gastrocnemius muscle per gram of mice in each group (pg/g, n=7, x̄±s)

Groups	TNF-α	IL-6	MCP-1
Sham operation	12.34 ± 3.34	10.47 ± 2.96	11.53 ± 2.12
Normal saline	98.15 ± 9.71 *	91.36 ± 8.46 *	87.56 ± 8.79 *
DATS	68.83 ± 7.11 #	56.89 ± 8.42 #	45.89 ± 9.45 #
DATS-HMSNs	21.11 ± 3.58 § &	17.22 ± 1.63 § &	22.15 ± 3.31 § &
F value	258.80	159.54	66.90
P value	<0.001	<0.001	<0.001

* P < 0.05 vs Sham operation group; # P < 0.05 vs Normal saline group; § P < 0.05 vs DATS group; & P < 0.05 vs Sham operation group.

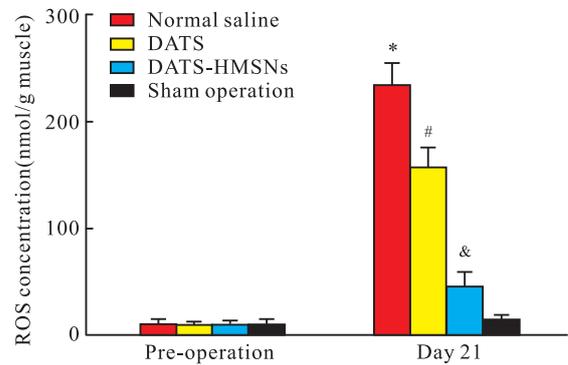


图7 各组小鼠腓肠肌内 ROS 浓度比较

Fig.7 Comparison of ROS concentrations in gastrocnemius muscles of mice in each group

* P < 0.05 vs DATS group; # P < 0.05 vs DATS-HMSNs group; & P < 0.05 vs Sham operation group.

3 讨论

下肢缺血性疾病是指由于各种原因导致下肢动脉狭窄或者闭塞、血流灌注不足,从而导致下肢出现一些间歇性跛行、溃疡或者坏疽等临床表现的一类疾病。治疗这类疾病的总体原则是通过手术或介入的方法快速重建血运,恢复缺血组织的血流灌注,最大限度地保存肢体,避免大截肢^[1]。然而,手术或介入的方法只是重建了大、中血管的血运,对病变累及小血管和末梢血管的疗效有限^[8]。此外,组织缺血、缺氧会影响细胞代谢,致使细胞内 ROS 浓度升高,导致氧化应激的发生,引起过度炎症反应,损伤血管内皮细胞,妨碍缺血后血管新生,进一步加重缺血^[9]。因此,业内专家提出治疗性血管新生,即将能促进血管生成的药物转入缺血组织,人为诱导血管新生和侧支循环建立,从而改善缺血部位血流灌注,使其重新获得足够的血供。硫化氢(hydrogen sulfide, H₂S)是继一氧化氮和一氧化碳之后的又一种内源性气体信号分子,它可以快速穿越细胞膜在细胞间传递信号,而不需要被再摄取或降解,是维持机体内环境稳态的关键因素之一^[10]。H₂S 的生理效应因器官而异,在循环系统中,经研究证实, H₂S 具有减轻氧化应激、抑制炎症反应、舒张血管以及促进血管新生等作用^[11]。近年来,大量研究展示了补充外源性 H₂S 用于治疗下肢缺血^[3]、脑缺血^[12]以及心肌缺血^[13]等诸多缺血性疾病的巨大潜力。DATS 是一种传统的 H₂S 供体,它在还原性谷胱甘肽等硫醇存在的条件下可以有效生成 H₂S^[14]。然而,由于机体内硫醇分布广泛,导致了 DATS 分解释放 H₂S 的选择性及释放速率无法调控,成药性较差^[15]。因此,开发一种可调控 DATS 释放的药物载体以达到控制释放 H₂S 的目的,从而为 H₂S 发挥其减轻氧化应激、抑制炎症反应和促进血管新生的作用提供保障。

本研究采用选择性蚀刻法成功制备出 HMSNs 纳米药物载体,并对其表面特征,载药率及药物累积释放率,生物相容性进行了分析。结果显示,该载体的粒径是(226.5 ± 11.8) nm,这种大小合适的纳米颗粒可以使其保持较高的渗透性,可以透过细胞膜进入到细胞内发挥作用。另外 HMSNs 对 DATS 的最大载药率为 27.89%, 7 d DATS 的累积释放率为 80.12%, 21 d 已达到 97.27%, 推断由于 HMSNs 特殊的空腔及孔道结构,实现了对 DATS 的有效装载和缓慢释放。纳米药物载体的生物相容性是衡量其

应用价值的又一重要指标,本研究以人脐静脉内皮细胞和人红细胞为模型考察了其生物相容性, HMSNs 在 400 μg/ml 水平下,人脐静脉内皮细胞细胞存活率可达 90% 以上,人红细胞溶血率 < 5%。DATS 在体内因其代谢快,影响其药效的持久性,以小鼠后肢缺血为模型,与 DATS 相比 DATS-HMSNs 可持久地释放 DATS,降低炎症因子(TNF-α、IL-6、MCP-1)和 ROS 水平,促进血管生长因子(bFGF、VEGF)释放,增加微血管和小动脉的密度(CD31、α-SMA)。上述结果表明,HMSNs 的生物相容性好,安全性高,在 DATS 的药物缓释方面有良好的应用前景。

参考文献

- [1] Farber A. Chronic limb-threatening ischemia[J]. *N Engl J Med*, 2018, 379(2): 171–80. doi:10.1056/NEJMc1709326.
- [2] Puccinelli M T, Stan S D. Dietary bioactive diallyl trisulfide in cancer prevention and treatment[J]. *Int J Mol Sci*, 2017, 18(8): E1645. doi:10.3390/ijms18081645.
- [3] Zhang T, Ouyang H, Liu S, et al. pH/Thermosensitive dual-responsive hydrogel based sequential delivery for site-specific acute limb ischemia treatment[J]. *J Mater Chem B*, 2022, 10(38): 7836–46. doi:10.1039/d2tb00474g.
- [4] Hosono T, Sato A, Nakaguchi N, et al. Diallyl trisulfide inhibits platelet aggregation through the modification of sulfhydryl groups[J]. *J Agric Food Chem*, 2020, 68(6): 1571–8. doi:10.1021/acs.jafc.9b05557.
- [5] Rose P, Moore P K, Zhu Y Z. Garlic and gaseous mediators[J]. *Trends Pharmacol Sci*, 2018, 39(7): 624–34. doi:10.1016/j.tips.2018.03.009.
- [6] Adep S, Ramakrishna S. Controlled drug delivery systems: current status and future directions[J]. *Molecules*, 2021, 26(19): 5905. doi:10.3390/molecules26195905.
- [7] Guo L, Ping J, Qin J, et al. A comprehensive study of drug loading in hollow mesoporous silica nanoparticles: impacting factors and loading efficiency[J]. *Nanomaterials*, 2021, 11(5): 1293. doi:10.3390/nano11051293.
- [8] Ismael A, Papoutsis E, Miserlis D, et al. The nitric oxide system in peripheral artery disease: connection with oxidative stress and biopterins[J]. *Antioxidants*, 2020, 9(7): 590. doi:10.3390/antiox9070590.
- [9] Hutchings G, Kruszyna L, Nawrocki M J, et al. Molecular mechanisms associated with ROS-dependent angiogenesis in lower extremity artery disease[J]. *Antioxidants*, 2021, 10(5): 735. doi:10.3390/antiox10050735.
- [10] Ding H, Chang J, He F, et al. Hydrogen sulfide: an emerging precision strategy for gas therapy[J]. *Adv Health Mater*, 2022, 11(4): e2101984. doi:10.1002/adhm.202101984.
- [11] Kolluru G K, Shackelford R E, Shen X, et al. Sulfide regulation of cardiovascular function in health and disease[J]. *Nat Rev Car*

- diol, 2023, 20(2): 109–25. doi:10.1038/s41569-022-00741-6.
- [12] Jia J, Li J, Cheng J. H₂S-based therapies for ischaemic stroke: opportunities and challenges [J]. *Stroke Vasc Neurol*, 2019, 4(2):63–6. doi:10.1136/svn-2018-000194.
- [13] Hu J, Xue Y, Tang K, et al. The protective effects of hydrogen sulfide on the myocardial ischemia *via* regulating BMAL1 [J]. *Biomol Pharmacother*, 2019, 120: 109540. doi:10.1016/j.biopha.2019.109540.
- [14] Sun H J, Wu Z Y, Nie X W, et al. Implications of hydrogen sulfide in liver pathophysiology: mechanistic insights and therapeutic potential [J]. *J Adv Res*, 2021, 27: 127–35. doi:10.1016/j.jare.2020.05.010.
- [15] Zhao Y, Wang H, Xian M. Cysteine-activated hydrogen sulfide (H₂S) donors [J]. *J Am Chem Soc*, 2011, 133(1): 15–7. doi:10.1021/ja1085723.

Preparation of allitridin nano-sustained release particles and experimental study on its protective effect on lower limb ischemia

Ouyang Huan¹, Liu Bo^{1,2}, Liu Yi^{1,2}, Zha Binshan¹, Ding Yang¹, Hu Xianyu¹, Chen Zhiyong¹

(¹*Dept of General Surgery, The First Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230022;*

²*The First Clinical College of Anhui Medical University, Hefei 230032)*

Abstract Objective To prepare hollow mesoporous silicon nanoparticles (HMSNs) loaded with allicin—diallyl trisulfide (DATS), and to study their feasibility as a therapeutic agent for ischemic injury of lower limbs. **Methods**

HMSNs were synthesized by selective etching, and their microstructure was observed by scanning and transmission electron microscopy. Their physical and chemical properties were analyzed by X-ray diffraction and dynamic light scattering (DLS). Their biological safety was tested by erythrocyte hemolysis and cytotoxicity experiments. DATS was loaded into HMSNs by adsorption to obtain DATS sustained release nanoparticles (DATS-HMSNs), and the cumulative release curve of DATS was calculated and produced by ultraviolet spectrophotometry. C57BL/6 mice were randomly divided into four groups (sham operation group, normal saline group, DATS group, and DATS-HMSNs group). Lower limb ischemia models were made by femoral artery ligation and resection. The exercise ability and the contents of tumor necrosis factor alpha (TNF- α), interleukin-6 (IL-6), monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1), reactive oxygen species (ROS), platelet-endothelial cell adhesion molecule (CD31), alpha smooth muscle actin (α -SMA), basic fibroblast growth factor (bFGF) and vascular endothelial growth factor (VEGF) in muscles of mice in each group before and after limb ischemia were tested. **Results** Scanning and transmission electron microscope observation showed that the prepared HMSNs were hollow, spherical and uniform in particle size. DLS results showed that the particle size was (226.5 \pm 11.8) nm. The results of red blood cell hemolysis test and cytotoxicity test showed that HMSNs had good biocompatibility. The maximum drug loading rate of HMSNs on DATS was 27.89%, the cumulative release rate of DATS in 7 days was about 80.12%, and could reach 97.27% in 21 days. Compared with the control group, after DATS-HMSNs were applied to mice with lower limb ischemia, immunohistochemical staining showed that the levels of CD31, α -SMA, bFGF and VEGF increased ($P < 0.05$). Elisa test showed that the levels of TNF- α , IL-6, MCP-1 and ROS decreased ($P < 0.05$), and the exercise ability of mice recovered satisfactorily after ischemia. **Conclusion** DATS-HMSNs can release DATS slowly and continuously, providing protection against ischemic injury of lower limbs.

Key words allitridin; diallyl trisulfide; hollow mesoporous silicon nanoparticles; lower limb ischemia; hydrogen sulfide; nano-drug delivery system

Fund program Natural Science Research Project of Anhui Educational Committee (No. KJ2020A0195)

Corresponding author Chen Zhiyong, E-mail: ayczy@163.com