DOI:10.16016/j.2097-0927.202404044

水蛭素-草酸二维生素 E 酯脂质体的构建及其体外抗凝作用评价

杨清华[1],张建祥[2],周振华[1] 400038 重庆,陆军军医大学(第三军医大学):第一附属医院神经内科[1],药学与检验医学系药剂学教研室[2]

[摘要] **目的** 基于维生素 E,构建同时具有过氧化氢清除功能和抗凝作用的脂质体,探讨其是否可以作为急性缺血性脑卒中的治疗方式并评价其体外抗凝作用。**方法** 利用过氧草酸酯键将两分子维生素 E(生育酚,VE)化学键合,得到目标化合物草酸二维生素 E 酯(oxalate vitamin E,OVE);通过酰胺化反应将抗凝药物水蛭素(hirudin)连接到亚油酸(linoleic acid, LA)得到抗凝目标单元亚油酸-水蛭素(LA-hirudin, LH);并通过红外光谱、核磁等手段对所合成的产物进行结构表征。采用薄膜分散法制备水蛭素-草酸二维生素 E 酯脂质体(hirudin-OVE liposome, HOL),采用激光粒度仪(DLS)和透射电子显微镜(TEM)等方法对脂质体进行表征。选取小鼠脑微血管内皮细胞(mouse brain-derived endothelial cells, bEnd3)和人脐静脉内皮细胞(human umbilical vein endothelial cells, HUVEC)进行细胞实验。通过 ELISA 测定过氧化氢以及细胞炎症因子 TNF-α、IL-6 和 IL-1β 水平,以评价脂质体对细胞氧化应激和炎症水平的影响。采用细胞计数实验(CCK-8)和细胞增殖检测实验(Edu)考察脂质体对细胞数目和细胞增殖情况的影响。取小鼠全血,考察所制备脂质体的抗凝作用。**结果** 核磁结果表明成功合成了 OVE,红外谱图结果表明水蛭素和亚油酸成功键合得到亚油酸-水蛭素。透射电镜和激光粒度仪结果表明所制备的脂质体形状为类球形,且粒径分布均匀,平均粒径为 161 nm。细胞实验表明,脂质体能够显著抑制模型细胞分泌过氧化氢和炎症因子,具有明显的抗氧化、抗炎作用($P<0.05$)。细胞计数实验和细胞增殖检测实验结果证明脂质体能够抑制炎症导致的细胞数目减少、缓解 LPS 刺激所引起的细胞增殖抑制($P<0.01$)。抗凝实验结果表明,脂质体能够显著抑制 $CaCl_2$ 诱导的凝血反应($P<0.01$)。**结论** 基于维生素 E 成功合成过氧化氢清除性材料 OVE,并以抗凝药物水蛭素和 OVE 制备 OVE 抗凝脂质体(HOL),该脂质体在细胞层面上具有良好的抗氧化、抗炎效果,并具有显著的抗凝作用。

[关键词] 过氧化氢清除性;脂质体;抗炎抗氧化;抗凝作用;草酸二维生素 E 酯;水蛭素
[中图法分类号] R914.5; R967; R977.25 [文献标志码] A

Construction of hydrogen peroxide-scavenging liposomes based on vitamin E and evaluation of its *in vitro* anticoagulant effect

YANG Qinghua[1], ZHANG Jianxiang[2], ZHOU Zhenhua[1] [1]Department of Neurology, First Affiliated Hospital, [2]Department of Pharmaceutics, Faculty of Pharmacy and Laboratory Medicine, Army Medical University (Third Military Medical University), Chongqing, 400038, China

[**Abstract**] **Objective** To construct vitamin E (tocopherol, VE)-based liposomes with both hydrogen peroxide-scavenging function and anticoagulant effect, and explore whether they can be used to treat acute ischemic stroke and then evaluate their *in vitro* anticoagulant effect. **Methods** Two molecules of VE were chemically bonded through peroxalate bond to obtain oxalate vitamin E (OVE). The anticoagulant unit LA-Hirudin was obtained by amidation reaction by connecting the anticoagulant drug hirudin to linoleic acid

[基金项目] 国家自然科学基金青年基金项目(82301516)
[通信作者] 周振华,E-mail:zhouzhenhua@tmmu.edu.cn

2097-0927/Copyright © 2024, 陆军军医大学(第三军医大学)。这篇开放获取文章遵循 CC BY 许可协议(https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/)

(LA). The structures of the synthesized products were characterized by using H nuclear magnetic resonance (^{1}HNMR) and FT-IR spectra. Hirudin-Oxalic acid divitamin E ester liposome (HOL) was prepared by thin film dispersion and characterized with dynamic light scattering (DLS) and transmission electron microscopy (TEM). Mouse brain-derived endothelial cells (bEnd3) and human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) were applied as the object of cell experiments. The levels of H_2O_2, and cellular inflammatory factors TNF-α, IL-6 and IL-1β were determined by ELISA to evaluate the effect of the liposomes on the severity of cellular inflammation. Cell counting kit-8 (CCK-8) assay and cell proliferation assay (5-Ethynyl-2′-deoxyuridine, Edu) were used to detect the effects of the liposomes on cell count and proliferation. The anticoagulant effect of the prepared liposomes was detected by using whole blood of mice. **Results** ^{1}HNMR spectrum showed that OVE was successfully synthesized, and the FT-IR spectrum displayed that hirudin and linoleic acid were successfully bonded to obtain LA-Hirudin. The results of DLS and TEM indicated that the prepared liposomes were spheroids, in uniform distribution, with an average particle size of 161 nm. The cell experiments showed that the liposomes significantly inhibited the secretion of H_2O_2 and inflammatory factors, and exerted obvious antioxidant and anti-inflammatory effects in the model cells ($P<0.05$). CCK-8 assay and Edu proliferation assay proved that the liposomes suppressed the decreased cell count and alleviated the inhibited cell proliferation caused by LPS ($P<0.01$). Anticoagulation experiment revealed that the liposomes had significant inhibitory effect of $CaCl_2$-induced coagulation reaction ($P<0.01$). **Conclusion** A hydrogen peroxide-scavenging function material, OVE is synthesized, and then anticoagulant drug hirudin and OVE are used to prepare OVE thrombolytic liposomes, HOL. The liposomes have antioxidant and anti-inflammatory effects at the cellular level and also have significant anticoagulant effect.

[**Key words**] hydrogen peroxide scavenging; liposome; anti-inflammatory and antioxidant; anticoagulant effect; oxalate vitamin E; hirudin

Supported by the National Natural Science Foundation for Young Scholars of China (82301516). Corresponding author: ZHOU Zhenhua, E-mail: zhouzhenhua@tmmu.edu.cn

急性缺血性脑卒中是最常见的卒中类型,是导致高致死和致残的最重要的中枢神经系统疾病[1-2]。大多数缺血性脑卒中是由于血栓阻塞供血血管,从而导致大脑局部缺血、缺氧,进而引起脑实质受损以及神经功能障碍[3]。缺血发生后,血栓局部随即出现过氧化氢诱导的细胞毒性、炎症细胞浸润以及促炎细胞因子水平的升高[4-6]。缺血性脑卒中最直接、有效的治疗手段是取栓治疗;而抗凝是机械取栓术后管理的重要环节。抗凝药物的使用旨在抑制血栓形成、抑制血管炎症反应,改善脑部血流供应,从而巩固治疗效果。但目前抗凝药物的使用有诸多局限性,包括药物出血风险高、适配患者范围窄、药物的半衰期较短以及抗凝效果受体内代谢影响较大等[4,7-9]。脂质体作为药物递送系统,为脑部药物递送提供了更好的选择。作为药物载体,脂质体具有延长药物半衰期、控制药物的释放、保护所包载的药物成分以及良好的安全性等诸多优势[10-12];同时根据药物递送目的不同,可以对脂质体表面进行相应的修饰,从而构建特殊功能的药物递送系统以用于治疗脑部疾病[13]。水蛭素能够抑制凝血酶、抑制血小板聚集、提高血瘀部位的血流速度,从而发挥抗凝效果。但水蛭素在体内的半衰期短,这严重限制了水蛭素的体内抗凝效果[14-16]。为了克服上述困难,并鉴于过氧化氢在缺血性卒中发生发展过程中的关键作用以及草酸酯键的过氧化氢响应性,本研究设计和开发了基于维生素 E(生育酚,VE)的具有过氧化氢清除性的草酸酯键 VE 衍生物草酸二维生素 E 酯(oxalate vitamin E,OVE),旨在利用 OVE,采用亚油酸连接水蛭素的方式构建过氧化氢清除性 OVE 抗凝脂质体(hirudin-OVE liposome, HOL),以期构建一种既能实现局部过氧化氢清除性,又可以发挥抗凝作用的脂质体,为急性缺血性脑卒中取栓术后的抗凝提供新选择。

1 材料与方法

1.1 试剂与仪器

无水 N,N-二甲基甲酰胺(N,N-dimethylformamide, DMF)、无水二氯甲烷(dichloromethane, DCM)、无水二甲基亚砜(DMSO)、甲醇、N-羟基丁二酰亚胺(N-hydroxysuccinimide, NHS)、1-(3-二甲基氨基丙基)-3-

乙基碳二亚胺(1-(3-dimethylaminopropyl)-3-ethylcarbodiimide, EDC)、4-二甲氨基吡啶(4-dimethylaminopyridine, DMAP)和4′,6-二脒基-2-苯基吲哚(4′,6-diamidino-2-phenylindole, DAPI)购自美国 Sigma-Aldrich 公司;1,2-二棕榈酰-rac-甘油-3-磷酸胆碱(1,2-dipalmitoyl-rac-glycero-3-phosphocholine, DPPC)、胆固醇(cholesterol, CHOL)、二异丙基乙胺(N, N-diisopropylethylamine, DIPEA)、α-生育酚(vitamin, VE)、草酰氯以及亚油酸购自美国 aladdin 公司;水蛭素购自广西科康科技有限公司;甲苯胺蓝购自北京索莱宝公司;二硬脂酰基磷脂酰乙醇胺甲氧基聚乙二醇{1, 2-distearoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine-N-[methoxy (polyethylene glycol)-2000], DSPE-PEG-2000}购自瑞士 Corden Pharma;无水氯化铁购自上海麦克林公司;ELISA 试剂盒购自美国 Proteintech Group 公司;过氧化氢检测试剂盒购自南京建成生物工程研究所;BeyoClick™EdU 细胞增殖试剂盒(含 Alexa Fluor 488)和 BCA 蛋白量测定试剂盒购自上海碧云天生物技术有限公司;青霉素、链霉素、胎牛血清(FBS)和高糖培养基(DMEM)购自美国 Gibco 公司;人脐静脉内皮细胞和小鼠脑微血管内皮细胞购自中科院细胞库。傅里叶变换红外光谱仪(Spectrum 100)购自美国 PerkinElmer 公司;激光粒度仪(MALVERN ZEN3690)购自荷兰 Malvern 公司;透射电子显微镜(TECNAI 10)购自荷兰 Philips 公司;高分辨质谱仪和核磁共振仪(Agilent DD2)购自美国 Agilent 公司。

1.2 *方法*

1.2.1 过氧化氢清除性材料的合成与表征 将 860 mg(2.0 mmol) α-生育酚、1 293 mg(10 mmol)缚酸剂 DIPEA 加入反应瓶中,并加入 10 mL DCM。将反应瓶置于冰水浴中,不断搅拌,缓慢滴入草酰氯 127 mg(1.0 mmol)。在氮气保护下搅拌 4~6 h,用薄层色谱法监测反应过程。反应完成后,在反应体系中加入 1 mL 乙醇,使反应猝灭。使用旋转蒸发仪旋蒸除去有机溶剂后,用 DCM 萃取反应溶液。将萃取所得的有机相用少量无水 $MgSO_4$ 干燥约 1 h。以正己烷/乙酸乙酯(20∶1)为洗脱液,采用硅胶柱层析分离粗产物,即得淡黄色的油状液体 OVE。采用高分辨质谱、核磁共振波谱(^{13}C NMR, ^{1}H NMR)以及红外光谱(FT-IR)对所制备材料的结构进行表征。

1.2.2 抗凝单元的合成与表征 称取亚油酸(196 mg),将其溶解于 10 mL DMF 中,加入 78 mg NHS、150 mg EDC 和 25 mg DMAP;将混合物溶液置于室温,氮气保护下磁力搅拌反应 3 h。随后称取 311 mg 水蛭素,将其溶于 25 mL DMF 中,将水蛭素加入上述混合物溶液中。氮气保护下搅拌 24 h,用去离子水进行透析 72 h,冻干即得亚油酸-水蛭素。材料的表征:采用核磁共振氢谱和红外光谱对材料的结构进行了表征。水蛭素是一种蛋白质多肽药物,因此采用 BCA 法测定脂质体中水蛭素的含量。将脂质体溶液浓度配置成 0.50 mg/mL,按照 BCA 试剂盒加入检测试剂,通过检测 562 nm 处的光密度确定蛋白质浓度,从而计算脂质体中水蛭素的含量。

1.2.3 过氧化氢清除性 OVE 抗凝脂质体的制备及其表征 采用薄膜蒸发法制备脂质体,方法如下:精密称取 10 mg 磷脂(DPPC)、1 mg 胆固醇(CHOL)、2 mg OVE、2.4 mg 制备的 DSPE-PEG-2000 以及 2.6 mg 亚油酸-水蛭素,将混合物置于反应瓶中,加入三氯甲烷使其彻底溶解。随后将反应瓶置于旋转蒸发仪上旋蒸以除去有机溶剂,此过程转速要均匀,尽量防止气泡产生。待反应体系在反应瓶底部均匀成膜后,加入适量去离子水。然后在恒温磁力搅拌器上对反应瓶内容物进行水化。将水合溶液水浴超声约 15 min,冰上进行探针超声 2 min(超声强度 40 W,间隔 1 s),得到的乳液即为有待进一步提纯的脂质体。后续将脂质体置于高速离心机中 3 500 r/min 离心 5 min,上层即为制备的 OVE 抗凝脂质体(HOL)。使用激光粒度仪检测脂质体的粒径大小、粒径分布和表面电位,采用透射电镜观察脂质体的形貌。

1.2.4 脂质体的生物学评价

1.2.4.1 脂质体缓解 LPS 刺激所引起的细胞增殖抑制效果 选用人脐静脉内皮细胞作为考察对象。使用含有 10%(v/v)胎牛血清、100 U/mL 青霉素和 100 μg/mL 链霉素的高糖培养基培养细胞,孵箱条件为 5%CO_2、37 ℃。

取无菌 96 孔板,每孔加入 100 μL 高糖完全培养基。将培养的 HUVEC 接种于 96 孔板中,细胞密度为每孔 1×10^4 个细胞;孵育过夜待细胞贴壁。对照组细胞仅用完全培养基处理 14 h;模型组细胞用完全培养基处理 2 h 后,加入 100 ng/mL LPS 处理 12 h;其余各组分别加入不同剂量的水蛭素(0、1、5、10、20、40 μmol/L)预处理 2 h 后,再加入同等剂量的 LPS。采用 CCK-8 试剂盒测定细胞活力。另外,对照组和模型组细胞按照上述实验方案处理;其余各组分别用草酸二维生素 E 酯脂质体(oxalate vitamin E liposome, OVL)、水蛭素或 HOL(水蛭素浓度为 20 μmol/L)预处理 2 h,再加入同等剂量的 LPS,然后用 CCK-8 法测定细胞活力。

此外,将人脐静脉内皮细胞和小鼠脑微血管内皮

细胞分别接种于12孔板中,37 ℃孵育过夜。随后各组细胞采取相同的处理方式(水蛭素浓度为20 μmol/L),使用Edu染色试剂盒对各组细胞进行染色。染色结束后用培养基洗涤,多聚甲醛固定,DAPI复染,封片后使用激光共聚焦观察拍照,Zen软件处理图像。通过荧光图像考察各组细胞的增殖水平。

1.2.4.2 脂质体的抗炎效果 取无菌12孔板,每孔加入1 mL高糖完全培养基。将人脐静脉内皮细胞接种于12孔板中,细胞密度为每孔1×10^5个细胞。孵育过夜,对照组细胞用完全培养基孵育14 h;模型组细胞用完全培养基孵育2 h,然后加入100 ng/mL LPS共同孵育12 h;另外3组细胞分别用OVL、水蛭素或HOL(水蛭素浓度为20 μmol/L)预处理2 h,然后加入100 ng/mL LPS共同孵育12 h。采用过氧化氢检测试剂盒检测细胞上清液过氧化氢水平,采用ELISA试剂盒检测细胞上清液中肿瘤坏死因子TNF-α、IL-6以及IL-1β水平。

1.2.4.3 脂质体的抗凝效果 将100 μL PBS、OVE脂质体、水蛭素、脂质体HOL(以4 mg/mL水蛭素定量)加入24孔培养皿中,在37 ℃孵箱中孵育5 min。PBS单独作为对照。然后缓慢加入300 μL枸橼酸钠抗凝处理过的全血,随后再加入50 μL 0.2 mol/L $CaCl_2$溶液。将上述混合液在37 ℃下孵育5 min。然后,在培养皿的小孔中加入15 mL去离子水,37 ℃孵箱中30 r/min摇匀10 min。血凝块之外的红细胞在去离子水中发生溶血现象。在541 nm处测定含血红蛋白溶液的光密度。以枸橼酸钠抗凝处理的全血在去离子水中的光密度为空白。最后,根据以下公式计算凝血指数(BCI)。凝血指数=(样品光密度)/(空白光密度)×100%

1.2.4.4 脂质体的稳定性及安全性评价 按照前述方法制备HOL,将脂质体原液分别用生理盐水和PBS溶液稀释5倍后,置于4 ℃冰箱中待测。分别于第1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14天取出脂质体溶液,使用激光粒度仪检测其粒径大小和表面电位;以此考察所制备脂质体长时间存放的稳定性。

取无菌96孔板,每孔加入100 μL高糖完全培养基。将培养的HUVEC接种于96孔板中,细胞密度为每孔1×10^4个细胞;孵育过夜待细胞贴壁,将细胞分组,分别加入不同剂量(2、5、10、20、50、125、250、500、1 000 μg/mL)的HOL。对照组为仅用新鲜完全培养基处理的细胞。孵育24 h后,采用CCK-8试剂盒测定各组细胞的细胞活力。

1.3 统计学分析

数据以$\bar{x}\pm s$表示,采用SPSS 20.0统计软件进行分析。各组数据近似正态分布(正态检验),对于多组间差异比较采用单因素方差分析。检验水准$\alpha=0.05$。

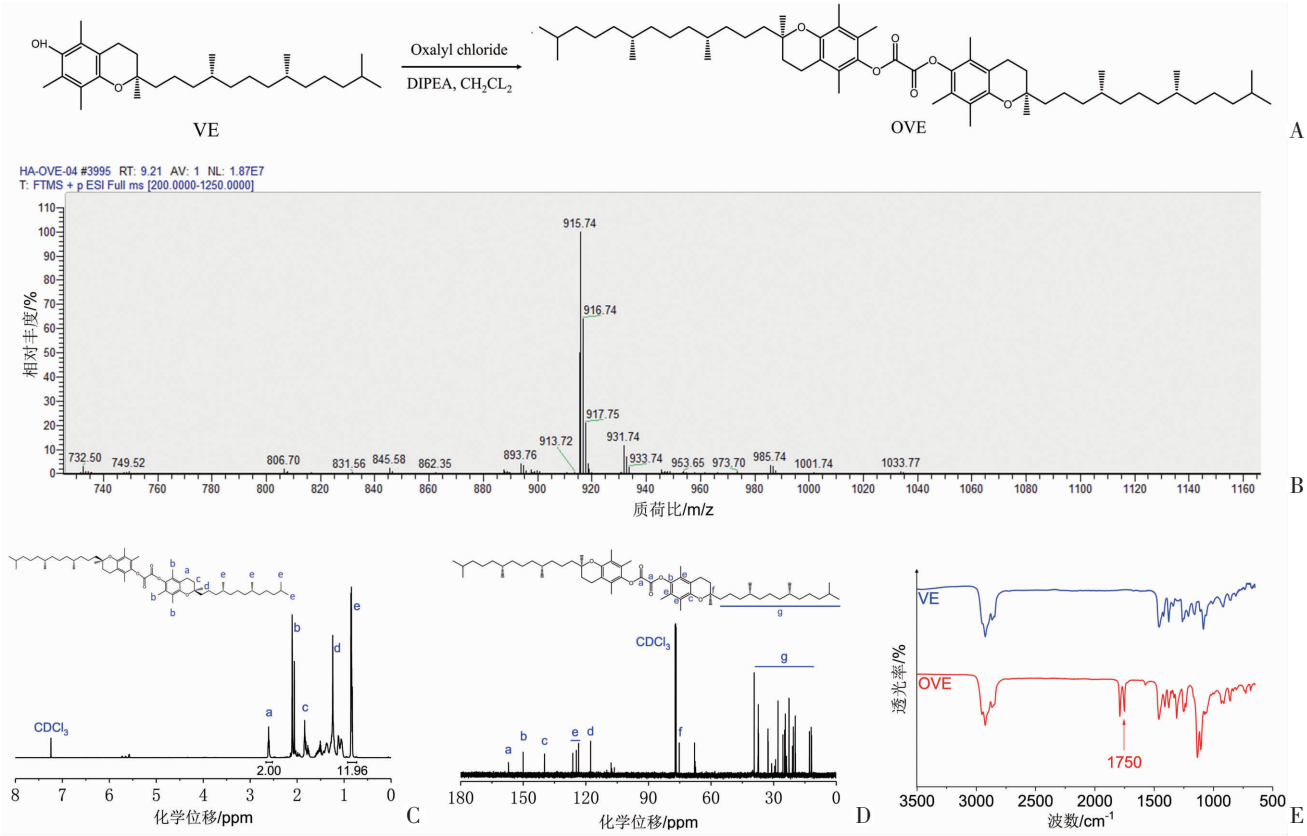
2 结果

2.1 过氧化氢清除性材料的核磁表征

在缚酸剂DIPEA作用下,两分子生育酚通过草酸酯键连接生成对称结构的目标化合物OVE(图1A)。该反应的收率为81.3%,柱层析得到的产物纯化后进行色谱分析的结果显示,OVE的纯度约为95.53%。通过高分辨质谱分析,目标化合物OVE理论分子量为914.74,测试数据为915.74,符合加质子峰特征(图1B)。同时OVE的相对丰度为m/z:914.74(100.0%)、915.74(66.3%)、916.74(22.1%)、917.75(4.6%)、918.75(1.0%);高分辨质谱图结果也符合目标化合物的丰度分布规律。结合高分辨质谱图,进一步表征OVE的核磁氢谱及碳谱。核磁氢谱图及目标峰积分表明OVE化合物的成功合成(图1C)。核磁碳谱结果显示(图1D),δ 157处的a峰符合OVE化合物中草酸酯键碳的出峰位置,其余峰的出峰情况也满足OVE的结构特征,这证实了OVE中草酸酯键的生成,表明OVE的结构正确。VE和OVE的红外光谱图显示(图1E),OVE位于1 750 cm^{-1}处出现羰基的吸收峰,这同样表明了过氧草酸酯键的生成;除此以外,OVE其他位置的峰于VE基本一致;由此可以判断OVE的成功合成。

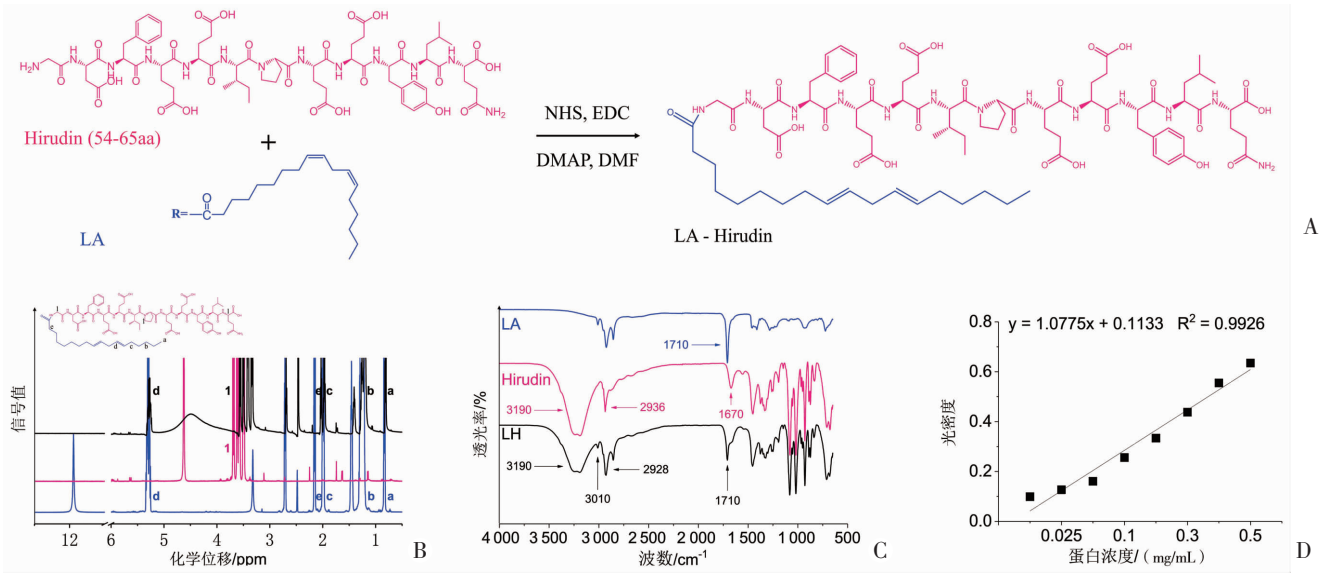
2.2 抗凝单元的合成与表征

在EDC和NHS的作用下,亚油酸通过酰胺键连接水蛭素生成目标化合物亚油酸-水蛭素(图2A);该反应的收率为69.1%。核磁氢谱图的结果表明目标化合物的成功合成(图2B)。结合核磁氢谱,进一步表征了亚油酸-水蛭素的红外光谱图。红外光谱图(图2C)显示,游离的亚油酸在1 710 cm^{-1}有酯键C=O的拉伸振动峰;游离的水蛭素在3 190 cm^{-1}有-OH的伸缩振动峰,在2 936 cm^{-1}出现了$-CH_3$或$-CH_2$的伸缩振动峰,同时1 670 cm^{-1}处出现了羧酸中C=O的拉伸振动峰;亚油酸-水蛭素在3 190 cm^{-1}出现-OH的伸缩振动峰,在3 010 cm^{-1}处有=C-H的伸缩振动峰,在2 928 cm^{-1}出现$-CH_3$或$-CH_2$的伸缩振动峰,在1 710 cm^{-1}出现酰胺键中C=O的拉伸振动峰。这证明水蛭素成功连接到亚油酸上,材料成功合成。BCA蛋白测定结果表明(图2D),在0.50 mg/mL浓度的脂质体溶液中,水蛭素浓度为(0.056±0.005) mg/mL,从而得到脂质体中水蛭素的负载率为(11.27±1.06)%。



A:OVE 合成示意图;B:OVE 高分辨质谱图;C:OVE 的核磁共振氢谱图;D:OVE 的核磁共振碳谱图;E:VE 和 OVE 近红外光谱图

图 1 OVE 合成及表征



A:亚油酸连接水蛭素的反应示意图;B:亚油酸-水蛭素核磁共振氢谱图;C:亚油酸、水蛭素以及亚油酸-水蛭素的红外光谱图;D:BCA 法蛋白浓度定量测定曲线

图 2 亚油酸连接水蛭素的反应示意图及其表征

2.3 过氧化氢清除性 OVE 抗凝脂质体的制备及其表征

激光粒度仪考察结果(图 3A)表明,所制备脂质体的平均粒径为 161 nm,粒径分布均匀,电位-30 mV 左右。透射电镜结果(图 3B)表明脂质体分散均匀,且外观为相似的类球形。

2.4 脂质体缓解 LPS 刺激所引起的细胞增殖抑制

运用 CCK-8 评价水蛭素对细胞的促增殖活性,发现相对于 40 μmol/L 的水蛭素,浓度为 20 μmol/L 的水蛭素已经达到药物作用的最大效应,增加剂量并不能继续提高药效(图 4A)。因此选用 20 μmol/L 的水蛭素作为后续实验所用浓度。随后,运用 CCK-8 评价了脂质体对细胞数目的影响(图 4B),发现与 OVL(P=0.011)和游离的水蛭素(P=0.022)相比,HOL 对炎症介导的细胞数目减少有更好的抑制效果。

运用 Edu 染色分别检测小鼠脑微血管内皮细胞和人脐静脉内皮细胞的增殖情况,与对照组相比,模型组细胞增殖明显被抑制;与模型组相比,治疗组的细胞增殖活性明显增加,且 HOL 促进细胞增殖的效果显著优于 OVL 和游离水蛭素(图 5)。

2.5 脂质体降低炎症因子水平

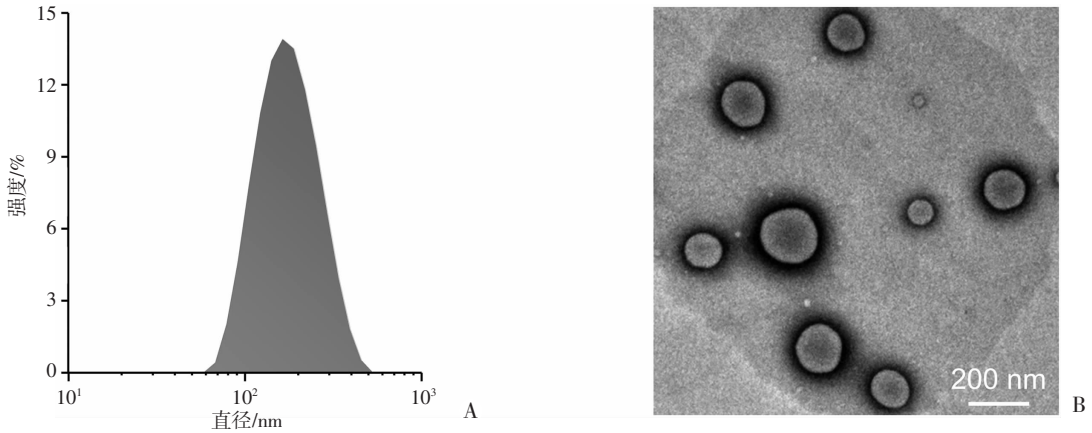
采用过氧化氢检测试剂盒检测细胞上清液过氧化氢水平(图 6A),HOL 能明显降低细胞过氧化氢的水平;与模型组相比,HOL 组过氧化氢的水平相对降低 50%以上(P<0.01)。采用 ELISA 试剂盒检测炎症因子(TNF-α、IL-6、IL-1β)水平(图 6B~D),模型组细胞上清中各炎症因子水平明显升高,OVL、游离水蛭素以及 HOL 组细胞上清炎症因子水平均明显降低,且 HOL 抑制炎症因子表达水平的作用更加明显(P<0.01)。以上均证明,HOL 具有显著的抗氧化应激、抗炎效果。

2.6 脂质体抑制凝血反应

抗凝血实验结果(图 7A)显示,与 PBS 组相比,OVL、游离水蛭素以及 HOL 组均能够抑制 $CaCl_2$ 诱导的凝血反应,且 HOL 的抗凝效果最为明显。用去离子水洗涤后,测定血红蛋白光密度得到的 BCI 指数(图 7B)也显示,相比于 PBS 组,HOL 组 BCI 明显增加(P<0.01)。证明 HOL 的抗凝效果更为明显。

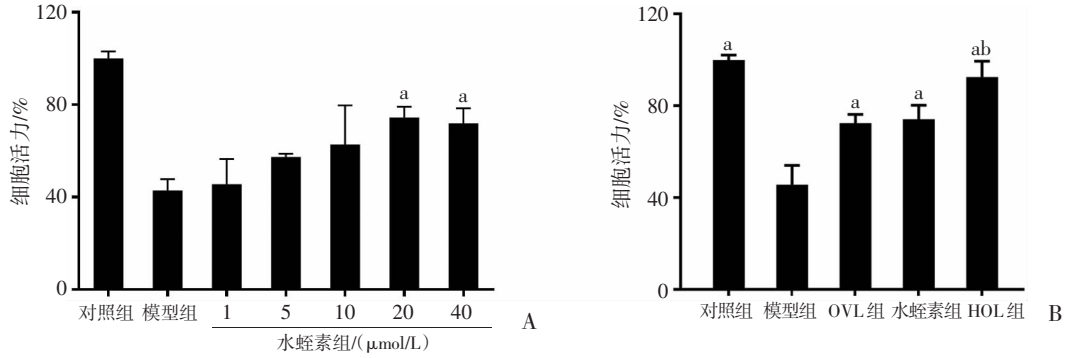
2.7 脂质体的稳定性及安全性评价

采用激光粒度仪检测 HOL 长时间存放的稳定性,发现脂质体在生理盐水和 PBS 溶液中 14 d 内的粒径大小和电位均没有明显变化(图 8)。初步证明所制备脂质体相对稳定,可长时间存放用于后续实验研究。



A:OVE 脂质体(HOL)的粒径分布;B:HOL 的透射电镜观察

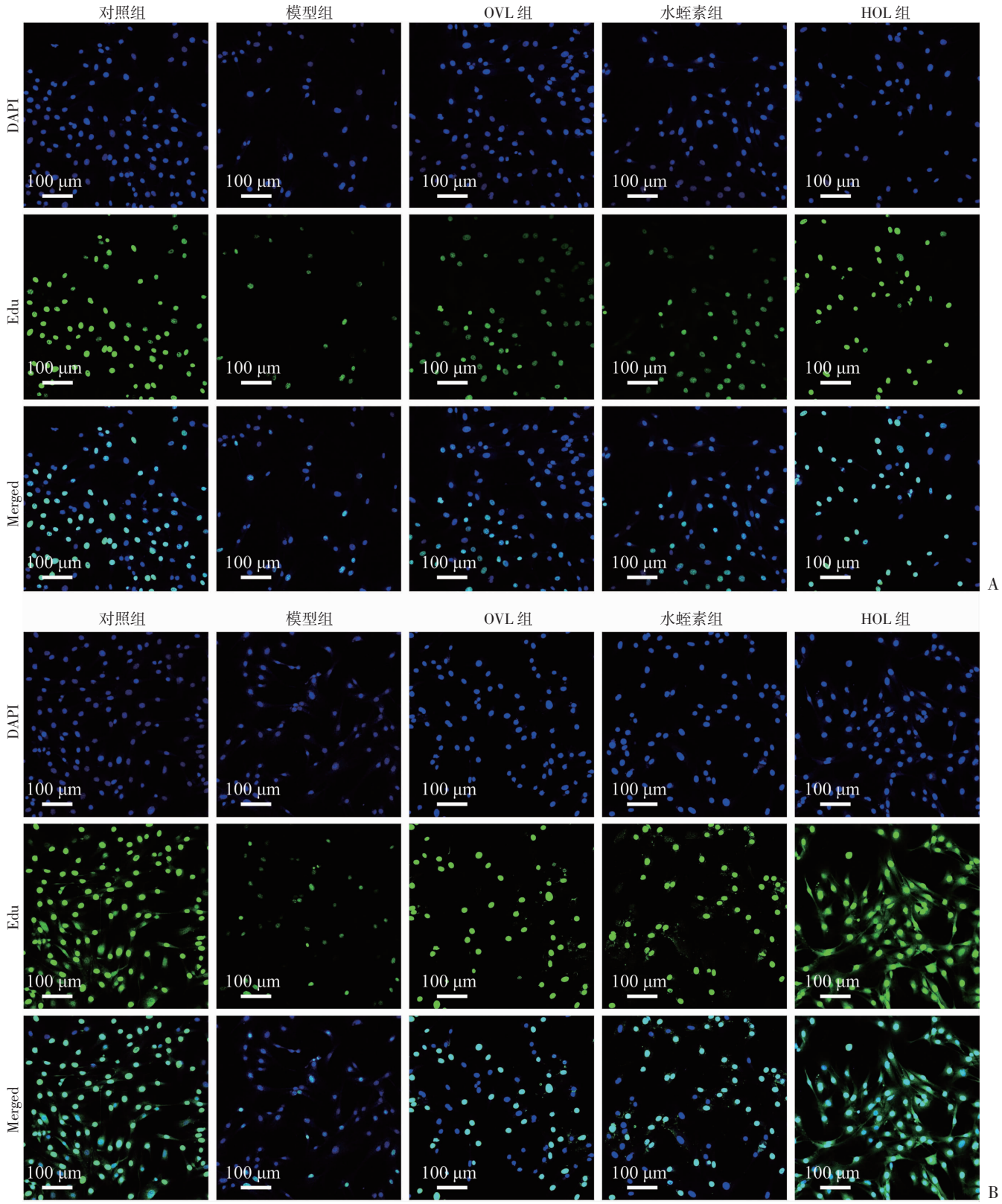
图 3 OVE 脂质体(HOL)的表征



a:P<0.01,与模型组比较;b:P<0.05,与 OVL、水蛭素组比较

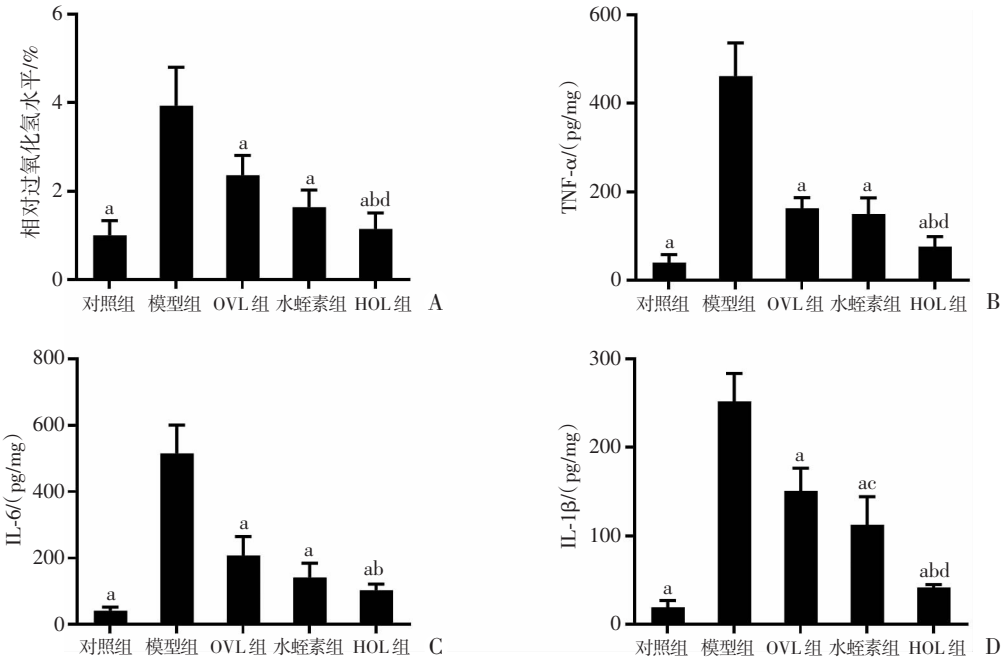
A:CCK-8 检测不同浓度的水蛭素对细胞活力的影响;B:CCK-8 检测不同药物处理对细胞活力的影响

图 4 脂质体对细胞活力的影响(n=5)



A:Edu 染色观察不同药物对人脐静脉内皮细胞增殖活性的影响;B:Edu 染色观察不同药物对脑微血管内皮细胞增殖活性的影响

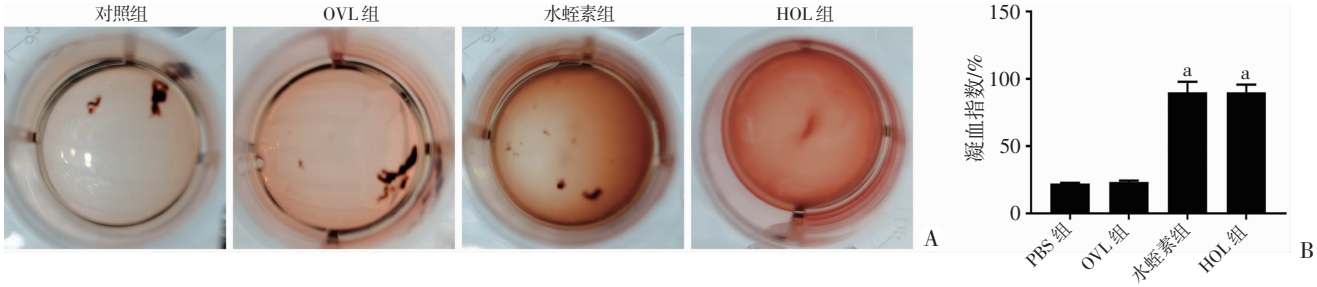
图 5 激光共聚焦显微镜下观察脂质体对人脐静脉内皮细胞和脑微血管内皮细胞增殖活性的影响($n=3$)



a: $P<0.01$,与模型组比较; b: $P<0.01$,c: $P<0.05$,与 OVL 组比较; d: $P<0.05$,与水蛭素组比较

A:细胞培养上清过氧化氢水平;B~D:细胞培养上清 TNF-α、IL-6 和 IL-1β 含量

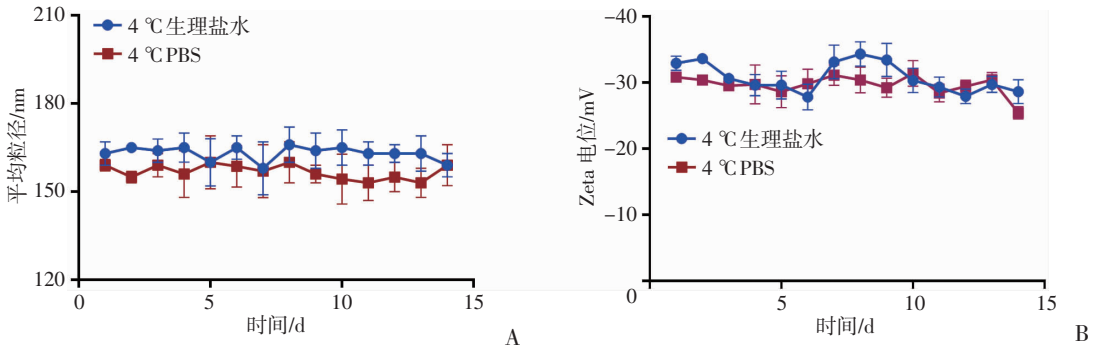
图 6 脂质体抑制细胞炎症水平和氧化应激水平($n=5$)



a: $P<0.05$,与 PBS 组比较

A:抗凝血实验;B:各组的 BCI 指数

图 7 脂质体的抗凝效果($n=3$)



A:平均粒径变化;B:电位变化

图 8 OVE 脂质体 HOL 的稳定性考察($n=3$)

运用 CCK-8 评价脂质体对细胞的毒性,发现浓度为 250 μg/mL 的脂质体与细胞共孵育 24 h,细胞活力高于 90%。即使脂质体的浓度高达 1 000 μg/mL,细胞与之共孵育 24 h 之后,细胞活力仍接近 80%(图 9)。初步证明了该方法制备的脂质体具有良好的生物安全性,可应用于后续体内抗凝实验研究。

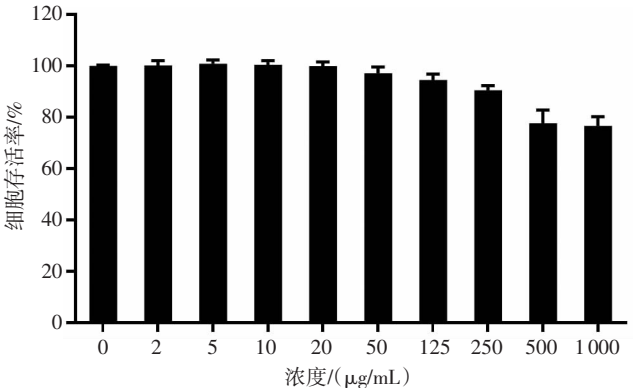


图 9 脂质体的安全性评价(n=3)

3 讨论

目前,针对血栓疾病,临床上主要采用抗血栓药物、小分子神经保护剂以及抗炎药物等治疗方式。这些药物普遍具有体内半衰期较短、药物的稳定性差、治疗效果有限以及靶向性差等缺陷[10-11]。因此,使用先进的递药系统提高药物性能和药理作用是一种治疗血栓疾病的新策略。然而,现有的递药系统设计相对复杂,构建成本高,靶向效率有待提高,且复杂的表面修饰增加了其临床转化的难度[10-12]。为了克服上述难题,本研究拟设计一款结构简单、作用明确且靶向效率高的递药系统用于治疗血栓疾病。

血栓局部的微环境特征是设计抗凝药物的依据。在血栓形成过程中,过氧化氢不仅参与血小板的活化,还能刺激剩余的血小板聚集在血栓部位,进一步促进血栓形成[17-19]。鉴于过氧化氢在血栓形成中的重要角色,本研究合成了基于维生素 E 的过氧化氢清除性材料 OVE。通过在亚油酸上连接抗凝药物水蛭素,我们采用薄膜分散法制备了过氧化氢清除性抗凝脂质体药物。脂质体在血栓微环境中发生过氧化氢响应性清除反应,草酸酯键断裂,OVE 水解为 VE 发挥抗炎抗氧化作用;同时脂质体负载的水蛭素在血栓部位发挥其抗凝作用;这种协同作用可能是脂质体治疗血栓疾病的机制。与已有的研究相比,本研究基于水蛭素-草酸二维生素 E 酯构建了脂质体,用于治疗血栓疾病。该脂质体制备简单,抗凝作用明确,且相对简单的结构为其临床转化提供了可能性。

OVE 制备成脂质体,遇过氧化氢水解为 VE,OVE 可以作为 VE 的前药,具有潜在的抗炎抗氧化作用,有待于进一步地研究其对炎症和氧化应激相关疾病的治疗功能;这为该脂质体的临床转化提供了更广阔的方向。同时,制备脂质体时,本研究选用了两亲聚合物 DSPE-PEG,下一步实验可以对 DSPE-PEG 进行靶向单元修饰,从而在脂质体上引入主动靶向单元,实现脂质体对血栓部位的主动靶向,进一步提高脂质体的治疗效果。鉴于血栓的组成成分,还可以通过表面修饰的方式在脂质体表面引入相应的靶向集团。血栓主要由红细胞、纤维蛋白以及血小板等构成;同时血栓形成部位有明显血管内皮损伤,内皮下胶原暴露;血小板在形成血栓的过程中释放血小板颗粒;另外,血栓素参与血小板激活,促进后续纤维蛋白的生成。血栓的组成结构以及参与血栓形成过程各因素都为我们提供了诸多靶向位点。同时,血栓微环境中的组织因子、凝血酶、纤维蛋白复合物以及中性粒细胞等都可以作为血栓微环境清除性材料的开发依据,这也指引我们后续设计构建多功能靶向药物,从而进一步实现更高效的药物递送。但针对目标化合物亚油酸-水蛭素的多样化表征仍是我们后续研究的重要内容;此外,脂质体对血栓微环境的影响是否都是积极的,以及如何进一步改善脂质体的性能使其发挥积极作用而非产生负向结果,这都是后续研究的重点。随着脂质体药物递送平台的高速发展以及对血栓疾病发病机制的不断深入探究,更为高效、智能、有效的脂质体药物将会被广泛应用于血栓疾病的治疗中。

参考文献:

[1] CAMPBELL B C V, DE SILVA D A, MACLEOD M R, *et al*. Ischaemic stroke[J]. Nat Rev Dis Primers, 2019, 5(1): 70. DOI: 10.1038/s41572-019-0118-8.

[2] WINSTEIN C J, STEIN J, ARENA R, *et al*. Guidelines for adult stroke rehabilitation and recovery: a guideline for healthcare professionals from the American Heart Association/American Stroke Association[J]. Stroke, 2016, 47(6): e98-e169. DOI: 10.1161/STR.0000000000000098.

[3] SALEHI OMRAN S, HARTMAN A, ZAKAI N A, *et al*. Thrombophilia testing after ischemic stroke: why, when, and what? [J]. Stroke, 2021, 52(5): 1874-1884. DOI: 10.1161/STROKEAHA.120.032360.

[4] MEINEL T R, WILSON D, GENSICKE H, *et al*. Intravenous thrombolysis in patients with ischemic stroke and recent ingestion of direct oral anticoagulants[J]. JAMA

Neurol, 2023, 80(3): 233-243. DOI: 10.1001/jamaneurol.2022.4782.

[5] STARK K, MASSBERG S. Interplay between inflammation and thrombosis in cardiovascular pathology[J]. Nat Rev Cardiol, 2021, 18(9): 666-682. DOI: 10.1038/s41569-021-00552-1.

[6] SHI K B, TIAN D C, LI Z G, *et al*. Global brain inflammation in stroke[J]. Lancet Neurol, 2019, 18(11): 1058-1066. DOI: 10.1016/S1474-4422(19)30078-X.

[7] SAPOSNIK G, BUSHNELL C, COUTINHO J M, *et al*. Diagnosis and management of cerebral venous thrombosis: a scientific statement from the American heart association[J]. Stroke, 2024, 55(3): e77-e90. DOI: 10.1161/STR.0000000000000456.

[8] MENDELSON S J, PRABHAKARAN S. Diagnosis and management of transient ischemic attack and acute ischemic stroke: a review[J]. JAMA, 2021, 325(11): 1088-1098. DOI: 10.1001/jama.2020.26867.

[9] NTAIOS G. Embolic stroke of undetermined source: JACC review topic of the week[J]. J Am Coll Cardiol, 2020, 75(3): 333-340. DOI: 10.1016/j.jacc.2019.11.024.

[10] KANSZ S, ELÇIN Y M. Advanced liposome and polymersome-based drug delivery systems: considerations for physicochemical properties, targeting strategies and stimuli-sensitive approaches[J]. Adv Colloid Interface Sci, 2023, 317: 102930. DOI: 10.1016/j.cis.2023.102930.

[11] KOUDELKA S, MIKULIK R, MAŠEK J, *et al*. Liposomal nanocarriers for plasminogen activators[J]. J Control Release, 2016, 227: 45-57. DOI: 10.1016/j.jconrel.2016.02.019.

[12] NANCE E, PUN S H, SAIGAL R, *et al*. Drug delivery to the central nervous system[J]. Nat Rev Mater, 2022, 7(4): 314-331. DOI: 10.1038/s41578-021-00394-w.

[13] SU D, CHEN Z, AN X, *et al*. MicroRNA-195 liposomes for therapy of Alzheimer's disease[J]. J Control Release, 2024, 365: 583-601. DOI: 10.1016/j.jconrel.2023.12.003.

[14] HEISE M, SCHMIDMAIER G, HUSMANN I, *et al*. PEG-hirudin/iloprost coating of small diameter ePTFE grafts effectively prevents pseudointima and intimal hyperplasia development[J]. Eur J Vasc Endovasc Surg, 2006, 32(4): 418-424. DOI: 10.1016/j.ejvs.2006.03.002.

[15] SIEPEN B M, SEIFFGE D J, FISCHER U. Anticoagulation after stroke: persistent uncertainties[J]. Curr Opin Neurol, 2022, 35(1): 55-61. DOI: 10.1097/WCO.0000000000001009.

[16] LI S T, ZHANG K, MA Z Y, *et al*. Biomimetic nanoplatelets to target delivery hirudin for site-specific photothermal/photodynamic thrombolysis and preventing venous thrombus formation[J]. Small, 2022, 18(51): e2203184. DOI: 10.1002/smll.202203184.

[17] ALCALÁ M, SÁNCHEZ-VERA I, SEVILLANO J, *et al*. Vitamin E reduces adipose tissue fibrosis, inflammation, and oxidative stress and improves metabolic profile in obesity[J]. Obesity, 2015, 23(8): 1598-1606. DOI: 10.1002/oby.21135.

[18] PASTORI D, PIGNATELLI P, CARNEVALE R, *et al*. Nox-2 up-regulation and platelet activation: novel insights[J]. Prostaglandins Other Lipid Mediat, 2015, 120: 50-55. DOI: 10.1016/j.prostaglandins.2015.03.010.

[19] D'AMICO A, CAVARRETTA E, FOSSATI C, *et al*. Platelet activation favours NOX2-mediated muscle damage in elite athletes: the role of cocoa-derived polyphenols[J]. Nutrients, 2022, 14(8): 1558. DOI: 10.3390/nu14081558.

(收稿:2024-04-12;修回:2024-05-13)

(编辑 吴培红)