DOI：10.12287/j.issn.2096-8965.20220307

负载黄芪甲苷的心脏—线粒体双靶向递药纳米胶束改善急性心肌梗死后心脏损伤

杨珂，李澜，樊官伟*

（国家中医针灸临床医学研究中心，天津中医药大学第一附属医院，天津 300193；
组分中药国家重点实验室，天津中医药大学，天津 301617）

【摘要】急性心肌梗死（Acute Myocardial Infarction，AMI）因其高患病率和致死率严重威胁人类健康，尽管药物、介入治疗和外科手术极大程度地降低了AMI的死亡率，但AMI后仍存在持续的心肌损伤。黄芪甲苷（Astragaloside IV，AST）是中药黄芪的主要活性成分之一，但由于AST的疏水性特征限制了其生物利用度。在本实验中，我们开发了一种血小板膜修饰的poly（d，L-lactic-Co-Glycolic Acid）-block（PLGA-b）-poly（Ethylene Glycol）（PEG）-Triphenylphosphonium（TPP）（PLGA-b-PEG-TPP）聚合物纳米胶束用于包裹AST，从“器官—细胞器”层面实现“心脏—线粒体”的双重靶向功效。我们首先通过透射电镜、动态光散射、药物释放、稳定性考察等方法对载药纳米胶束进行了表征；采用活体成像法证实了载药纳米胶束的心脏靶向功效；运用小动物心脏超声、组织学、血清酶学考察了载药纳米胶束对缺血再灌注（Ischaemia/Reperfusion，I/R）后心脏功能和心肌损伤的影响；通过考察线粒体形态、膜电位、活性氧（Reactive Oxygen Species，ROS）以及血清和心脏中炎症因子水平，评价了载药纳米胶束对心脏线粒体功能和炎症的影响，实验结果显示，相较于游离的黄芪甲苷，载药纳米胶束显著改善了I/R后心脏功能、心肌损伤、线粒体损伤以及心脏炎症，提示载药纳米胶束显著改善了AST的生物利用度和心脏保护活性。本实验的开展为疏水性中药活性单体的递送提供了一种全新策略。

【关键词】缺血再灌注；黄芪甲苷；心脏靶向；线粒体靶向

中图分类号：R972，R318　　**文献标识码**：A　　**文章编号**：2096-8965（2022）03-0045-12

Astragaloside IV- loaded heart-mitochondria dual-targeted nanomicelles improved heart injury after acute myocardial infarction

Yang Ke, Li Lan, Fan Guanwei*

(National Clinical Research Center for Chinese Medicine Acupuncture and Moxibustion, First Teaching Hospital of Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 300193, China;
State Key Laboratory of Modern Chinese Medicine, Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 301617, China)

【**Abstract**】Acute myocardial infarction(AMI) is a serious threat to human health due to its high morbidity and mortality. Persistent myocardial injury remains after AMI, although the mortality of AMI has been greatly reduced by drugs, interventional therapy and surgery. Astragaloside IV(AST) is one of the main active components of Astragali Radix. However, the hydrophobicity of AST limits its bioavailability. In this experiment, we developed a platelet membrane-modified poly(d, L-lactic-Co-Glycolic Acid) -block(PLGA-b) -poly(Ethylene

收稿日期：2022-05-27；**修回日期**：2022-09-05

基金项目：天津市教委科研计划（2021KJ131）

通讯作者：樊官伟（1977-），男，河南许昌人，研究员，博士生导师，主要从事中医药防治心血管疾病基础和临床研究。E-mail：guanwei.fan@tjutcm.edu.cn

Glycol)(PEG)-Triphenylphosphonium(TPP)(PLGA-b-PEG-TPP) polymer nanomicelles for encapsulating AST to achieve the dual targeting effect of ' heart-mitochondria ' from the ' organ-organelle ' level. In this study, the drug-loaded nanomicelles were characterized by transmission electron microscope, dynamic light scattering, drug release and stability investigation. The cardiac targeting effect of drug loaded nanomicelles was confirmed by in vivo imaging. The effects of drug-loaded nanomicelles on cardiac function and myocardial injury after I/R were investigated by echocardiography, histology and serum enzymology. The effects of drug-loaded nanomicelles on cardiac mitochondrial function and inflammation were evaluated by examining mitochondrial morphology, membrane potential, reactive oxygen species(ROS)and levels of inflammatory factors in serum and heart. Compared with the free AST, the results showed that drug-loaded nanomicelles significantly improved cardiac function, myocardial injury, mitochondrial damage and cardiac inflammation after I/R . It was suggested that the drug loaded nanomicelles significantly improved the bioavailability and cardioprotective activity of AST. This experiment provides a new strategy for the delivery of hydrophobic active monomer of traditional Chinese medicine.

【Keywords】 Ischemia-reperfusion; Astragaloside IV; Cardiac targeting; Mitochondrial targeting

前言

急性心肌梗死（Acute Myocardial Infarction，AMI）是指以冠状动脉急性、持续性缺血缺氧引起的心肌坏死，是心血管疾病中常见的急危重症，具有较高的发病率、致残率及致死率，已成为全球心血管疾病死亡的主要原因[1]。中国心血管健康与疾病报告指出，我国心血管病患者人数约为2.9亿，而其中心肌梗死患者已达到250万，死亡率已上升至因疾病致死第二位[2]。预计到2030年，我国的心梗患者将达到近2 300万，必将成为严重的社会和医疗资源负担。尽管在过去三十多年中，直接经皮冠状动脉介入治疗和心脏外科搭桥术的开展，有效减少了急性心肌梗死的病死率，但是患者术后心肌梗死再发率和慢性心力衰竭发病率却逐渐增高，有些经过溶栓和血管重建治疗的患者心功能仍不断下降，极大降低了患者的生活质量，甚至危及生命[3]。因此，如何有效改善AMI后心脏损伤，寻找有效治疗策略，是心血管病领域目前亟待解决的一项重要课题。

黄芪为中医临床常用中药材之一，具有补气升阳、生津养血、行滞通痹等功效，常用于心血管疾病的治疗。黄芪甲苷（Astragaloside Ⅳ，AST）是其主要活性成分之一，现代药理研究表明AST具有抑制心肌细胞肥大、改善心肌能量代谢、改善心室重构、促进血管生成、抗炎、抗氧化应激及抑制心肌细胞凋亡等多种药理作用[4]，课题组前期研究已证实AST可显著改善心脏缺血再灌注诱导的心肌损伤[5]。然而，由于AST的疏水性特征导致其口服生物利用度较低，极大限制了AST的临床应用。

线粒体损伤是心肌细胞坏死的主要原因之一。心肌细胞中的ROS主要合成于线粒体，AMI后线粒体功能障碍会导致ROS大量合成并释放到细胞质中，从而加重心肌损伤[6]。因此，靶向心肌线粒体的药物设计已成为心血管领域的研究热点。线粒体的双层磷脂结构呈现出负膜电位[7]，使用亲脂性阳离子，如三苯膦（Triphenylphosphonium，TPP）、地喹（Dequalinium，DQA）、七甲碱染料、环金属化铱配合物和罗丹明衍生物等，修饰药物分子已成为靶向线粒体药物输送的最有效策略[8]。其中，TPP具有较低的生物毒性[8]，携带TPP的聚合物纳米胶束已成为线粒体靶向递送药物的主要候选者。PLGA-b-PEG是FDA批准的可药用聚合物胶束[9]。PLGA-b-PEG聚合物在形成聚合物纳米胶束的过程中，疏水PLGA~段被保留在纳米颗粒内部，可以将疏水性药物负载在纳米胶束的内核区域；而亲水PEG~段形成纳米胶束的稳定外壳，致使PLGA -b-PEG纳米胶束具有极高的组织亲和性和可生物降解性[10]。此外，PEG~段可用于结合活性靶向分子，结合TPP后的PLGA-b-PEG可实现疏水性药物的线粒体靶向递送[11]。

在本研究中，我们制备了负载黄芪甲苷的PLGA-b-PEG-TPP聚合物纳米胶束，并使用人血小板膜包覆该聚合物纳米胶束，使其具备心脏靶向功能。通过制备AMI后心肌损伤动物模型证实了血小板膜包覆的负载黄芪甲苷的PLGA-b-PEG-TPP聚合物纳米胶束（Platelet@PLGA-PEG-TPP@AST）

可靶向心脏—线粒体双递送黄芪甲苷，与游离的黄芪甲苷相比，我们开发的Platelet@PLGA-PEG-TPP@AST显著减少了心肌线粒体损伤，进而改善了心脏功能。我们的研究表明，使用该心脏—线粒体双靶向递药体系可提高中药有效单体的心血管治疗活性，并具有较好的临床应用前景。

1 方法

1.1 材料和动物

材料：黄芪甲苷（Astragaloside Ⅳ）购自上海融合医药科技发展有限公司；人血小板购自中国医学科学院血液病研究所；PLGA-PEG-TPP聚合物纳米胶束委托西安瑞禧生物合成；铝酞菁购自Sigma；线粒体膜电位检测试剂盒（JC-1），线粒体提取试剂盒，Gluta固定液（电镜专用，2.5%），2%TTC染色液均购于北京索莱宝科技有限公司；活性氧检测试剂盒（S0033S），Mitotracker线粒体荧光探针（C1049B-50 μg），抗荧光淬灭封片液（含DAPI）均购于北京碧云天生物技术有限公司；H&E染色试剂盒购于武汉塞维尔生物科技有限公司。

动物：健康雄性8周龄C57BL/6小鼠（合格证号：11401300027002），体重（20±1）g，SPF级，购于北京维通利华生物科技股份有限公司，许可证号为SCXK（京）2014-0004。实验动物饲养于天津中医药大学SPF级动物房中，室温21°C~24°C，相对湿度42%~58%，明暗环境各12 h交替饲养。所有动物和手术程序均经天津中医药大学伦理委员会批准实施（TCM-LAEC20221099）。

1.2 负载黄芪甲苷的心脏线粒体靶向递药体系制备

PLGA-PEG-TPP@AST制备：使用纳米沉淀法制备负载AST的PLGA-PEG-TPP聚合物纳米胶束，制备方法参考Hamide Sena Ozbay的研究[12]和课题组以往发表文章[13, 14]。简而言之，将PLGA-PEG-TPP和AST [聚合物/AST比例为5∶1(w/w)]溶解在1 mL乙腈中。将混合物逐滴加入到纳米纯水中，同时以900 rpm的速度搅拌过夜以除去有机溶剂并引发纳米颗粒形成。将纳米颗粒悬浮液以40 000 g离心30 min。使用超纯水冲洗纳米颗粒以去除残留的聚合物和卸载的药物。

Platelet@PLGA-PEG-TPP@AST制备：人源血小板提取自O^+型血小板的血浆，并通过反复冻融5次获得血小板膜，方法参考Zhuang等[15]的研究。将制备所得的PLGA-PEG-TPP@AST纳米胶束与血小板膜混合（浓度保持一致，均为50 μM），4℃超声3 min，37℃孵育1 h，期间轻弹管壁使血小板膜与纳米胶束充分混合。随后4℃，10 000 g离心2 h，PBS重悬后储存于-80℃备用。

1.3 负载黄芪甲苷的心脏线粒体靶向递药体系表征

药物表征方法参考课题组以往发表文章[13, 14]。载药量（DL%）和包封率（ER%）：简而言之，以1.2中方法制备纳米胶束，AST投药量为5 mg，加入适量乙腈破坏纳米胶束结构，涡旋30 s后超声离心15 min，12 000 rpm离心15 min后取上清液进样HPLC测定载药量和包封率。透射电镜（Transmission Electron Microscopy，TEM）：取纳米胶束溶液适量，适当稀释后滴于覆盖碳膜的电镜铜网上，磷锡酸负染，室温干燥置于透射电镜（日立，HT7700）下观察纳米粒的外观形态并拍照。动态光散射（Dynamic Light Scattering，DLS）：采用Malvern粒度仪，以动态光散射法测定混合胶束的粒径及其分布。为防止多散射现象，样品均用去离子水稀释至适当浓度后测定。体外释放：采用透析法考察Platelet@PLGA-PEG-TPP@AST纳米胶束的体外释放行为，释放介质为含0.5%吐温的PBS溶液。取Platelet@PLGA-PEG-TPP@AST纳米胶束溶液加入到预溶胀的透析袋内扎紧袋口，置于37°C恒温水浴，振荡下进行释放实验。分别于0，15，30 min和1，2，4，6，8，10，12，24，36，48，72 h取样0.5 mL，同时补入等量37°C空白释放介质，采用HPLC法测定AST的浓度。稳定性实验：取Platelet@PLGA-PEG-TPP@AST纳米胶束溶液置于室温环境中，分别于0，1，2，6，12，24，48和72 h采用DLS法检测Platelet@PLGA-PEG-TPP@AST粒径分布。

1.4 AMI模型制备及给药

模型制备：采用I/R的方法制备小鼠模型，模拟临床AMI后心肌损伤。简而言之，各组小鼠于术前禁食12 h，自由饮水，使用5%三溴乙醇（30 mg/kg）腹腔注射麻醉。小鼠麻醉后连通呼吸机，剪开皮肤，分离胸肌；使用撑胸器撑开3、4肋骨；剥开心包膜，使用7/0无创缝合线，结扎心脏主动脉左前降支（活扣），造成急性心肌梗死。梗死1 h后，缓慢拖拽缝合线，使滑结松开，抽出缝合线，恢复血流灌注。假手术组只穿线，不进行结扎，其余处理同上。

给药：于手术前经尾静脉注射Platelet@PLGA-PEG-TPP@AST（AST浓度为：5.84 mg/kg体重，

AST用量参考课题组以往发表文章[13, 16]，并由包封率换算得出），Platelet@PLGA-PEG-TPP组尾静脉注射同体积空白纳米胶束载体；游离AST采用腹腔注射相同体积AST混悬液（AST浓度为：5.84 mg/kg体重）；假手术和模型组经尾静脉注射相同体积的生理盐水。

1.5 心脏超声

应用小动物超声仪（Vevo2100，Visual Sonics）评价各实验组小鼠心脏功能。小鼠胸部心脏区域备皮后，使用异氟烷麻醉小鼠并固定在操作台上；将探头（MS-250）延心脏长轴摆放并在B-Mode模式下获得长轴切面，微调探头角度使获得图像中可见左心室，主动脉和二尖瓣瓣叶；在M-Mode模式下，使测线位于左心室最大腔径处，侧切乳头肌并获得M-mode图像；测量并计算左室射血分数。

1.6 活体成像

手术后72 h，使用5%三溴乙醇（30 mg/kg）腹腔注射麻醉小鼠，经腹主动脉冲洗心脏后，取心脏、肾脏和肝脏用IVIS Kinetic（Caliper）获得荧光图像，并计算心脏荧光辐射效率。

1.7 TTC染色

手术后72 h，使用5%三溴乙醇（30 mg/kg）腹腔注射麻醉小鼠，经腹主动脉冲洗心脏后，取心脏，平均切成5个横向切片，加入TTC溶液，于37℃避光孵育30 min。切片PBS洗涤3次后成像。梗死的心肌被染成白色，活组织被染成红色，成像结果使用ImageJ软件分析。

1.8 组织学染色

手术后72 h，使用5%三溴乙醇（30 mg/kg）腹腔注射麻醉小鼠，经腹主动脉冲洗心脏后，取心脏置于30%蔗糖溶液中脱水48 h，使用OCT包埋心脏组织并置于-80℃冷冻，随后使用冰冻切片机器制备5 μM切片，并进行苏木精/伊红染色（H&E）。心脏切片ROS染色按照试剂盒说明进行操作，简而言之，按1:1000用无血清培养液稀释DCFH-DA，随后滴加于冰冻切片，37℃孵育20 min后，PBS缓冲液洗涤3次，使用含DAPI封片剂封片后置于共聚焦显微镜（LSM710，蔡司）下观察。

1.9 血清生化及炎症因子检测

各实验组小鼠经腹主动脉取血，血液置于37℃水浴中恒温静置30 min，随后以4℃，3 500 rpm离心10 min，取血清分装于1.5 mL EP管中并放于-80℃冰箱备用。采用全自动生化仪分析血清中肌酸激酶（CK）、肌酸激酶同工酶（CK-MB）和乳酸脱氢酶（LDH）含量。采用Elisa法检测血清白介素1β（IL-1β）、白介素6（IL-6）和肿瘤坏死因子α（TNF-α）含量，按照试剂盒说明进行操作。心脏内炎症因子（IL-1β、IL-6和TNF-α）水平通过RT-PCR法检测，IL-1β、IL-6和TNF-α引物序列如下：

IL-1β (mice)，Forward：5‘-TGTGCTCTGCTT-GTGAGGTGCTG -3’，Reverse：5‘-GCCGTG-GTTG-GAGAGATAGG-3’。

IL-6 (mice)，Forward：5‘-TAGTCCTTCCTACCC-CAATTTCC-3’，Reverse：5‘-TTGGTCCTTAGC-CACTCCTTC-3’。

TNF-α (mice)，Forward：5‘-GGTGATCG-GTCCCCAAAGGGATGA-3’，Reverse：5‘-TG-GTTTGCTACGACGTGGGCT-3’。

1.10 线粒体功能检测

使用线粒体提取试剂盒从心脏组织分离完整且纯化的线粒体，通过BCA法测定线粒体蛋白质含量。根据线粒体膜电位检测试剂盒（JC-1）、活性氧检测试剂盒及Mitotracker线粒体荧光探针等产品说明书分别测定线粒体膜电位（ΔΨm）、线粒体内ROS水平和线粒体活性，以评价线粒体相关功能。心肌透射电镜检查：随机切取心脏梗死边缘区1×1×1 mm^3大小的组织块，于Gluta固定液中4℃固定72 h以备通过透射电镜进行超微结构观察和拍照。

1.11 统计

实验数据用SPSS 24.0软件包进行统计学处理。实验结果以均数±标准差（$\bar{x}\pm s$）表示，组间比较采用单因素方差分析（one-way ANOVA）。$P<0.05$为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 心脏线粒体靶向递药体系的制备与表征

在本研究中，我们制备了一种具有“心脏—线粒体”靶向功能的中药单体的递药体系。首先制备了负载AST的PLGA-PEG-TTP自组装胶束（PLGA-PEG-TPP@AST），PLGA~具有高脂溶性分子亲和力，而TPP具有线粒体靶向特征[17]，故PLGA-PEG-TPP@AST可靶向线粒体发挥治疗功效。由于AMI后血小板活化并向心脏受损部位聚集[18]，血小板膜包覆的PLGA-PEG-TPP@AST，即Platelet@PLGA-PEG-TPP@AST，可实现AMI后“心脏—线粒体”靶向递送黄芪甲苷（见图1）。

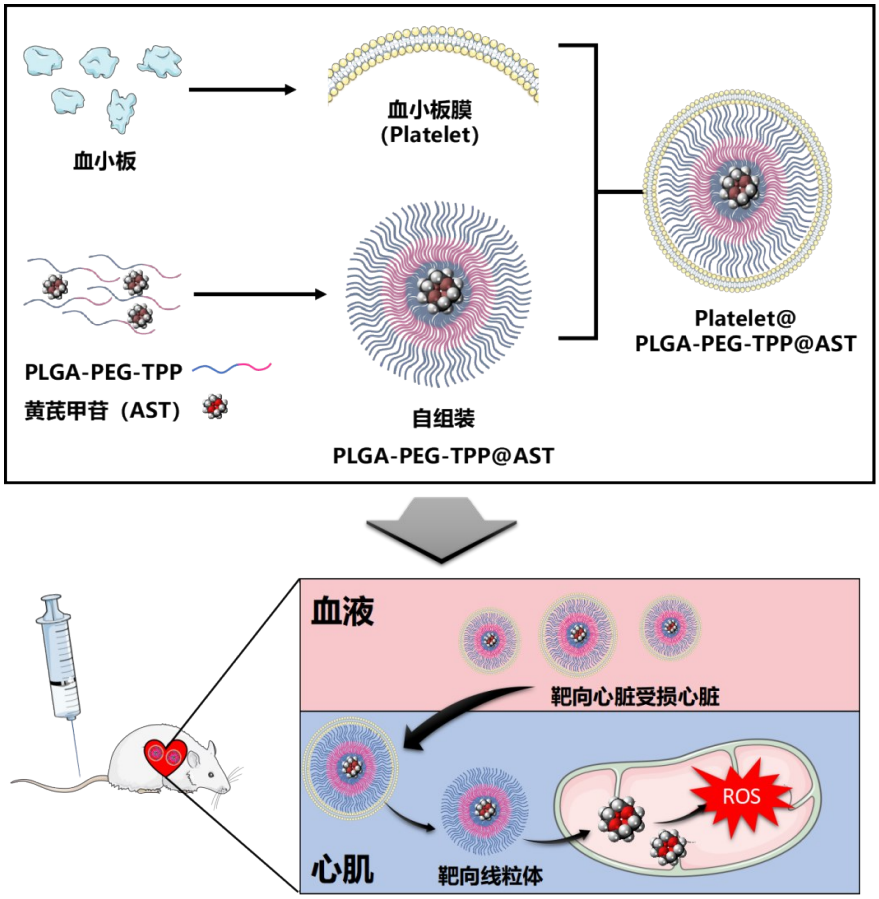
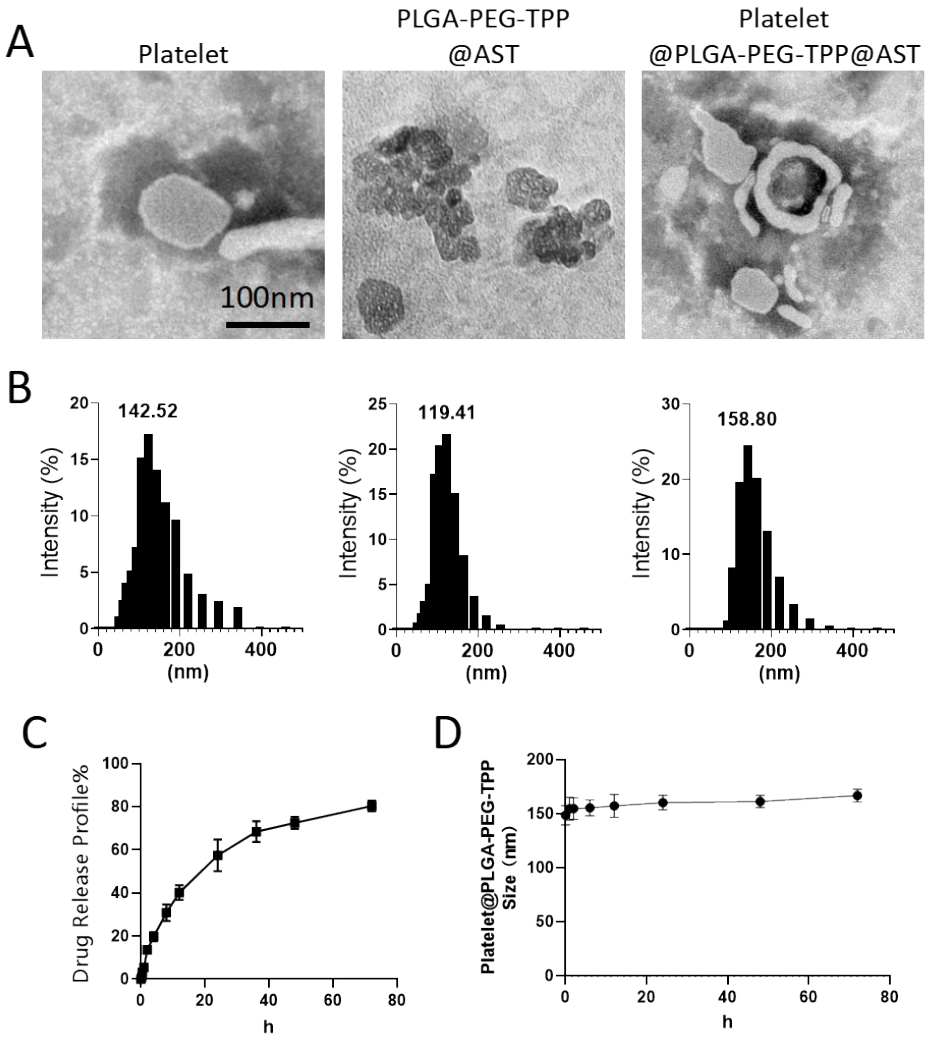


图1　负载黄芪甲苷的心脏线粒体靶向递药体系制备及作用示意图

为确保Platelet@PLGA-PEG-TPP@AST的顺利制备，我们对制备过程中的关键中间物进行了表征，使用TEM和DLS表征了人源血小板膜（Platelet）和PLGA-PEG-TPP@AST的结构和粒径分布（见图2A-B），TEM结果显示，Platelet具有典型的双分子层脂膜结构，且粒径约为100 nm；DLS结果显示了Platelet粒径呈正态分布，且平均粒径约为142.52 nm。PLGA-PEG-TPP@AST的TEM和DLS结果显示，其形态为球型胶束，且平均粒径约为119.41 nm。随后，我们又对完整体系Platelet@PLGA-PEG-TPP@AST进行了表征（见图2 A-B），TEM结果显示，Platelet成功修饰在PLGA-PEG-TPP@AST表面，且Platelet@PLGA-PEG-TPP@AST的平均粒径约为158.80 nm。我们通过HPLC评价了Platelet@PLGA-PEG-TPP@AST的包封率和载药量，结果显示，其包封率约为84.32%；其载药量约为16.73%。药物溶出实验显示出Platelet@PLGA-PEG-TPP@AST具有缓释功效，72 h时AST释放率约为80%（见图2 C）。未负载AST的Platelet@PLGA-PEG-TPP显示出较好的稳定性，其粒径0-72 h内无显著改变，且均一性较好（见图2 D）。综上所述，我们成功制备了Platelet@PLGA-PEG-TPP递药体系，为后续使用该体系“心脏—线粒体”靶向递送黄芪甲苷治疗AMI后心脏损伤提供了基础和保障。

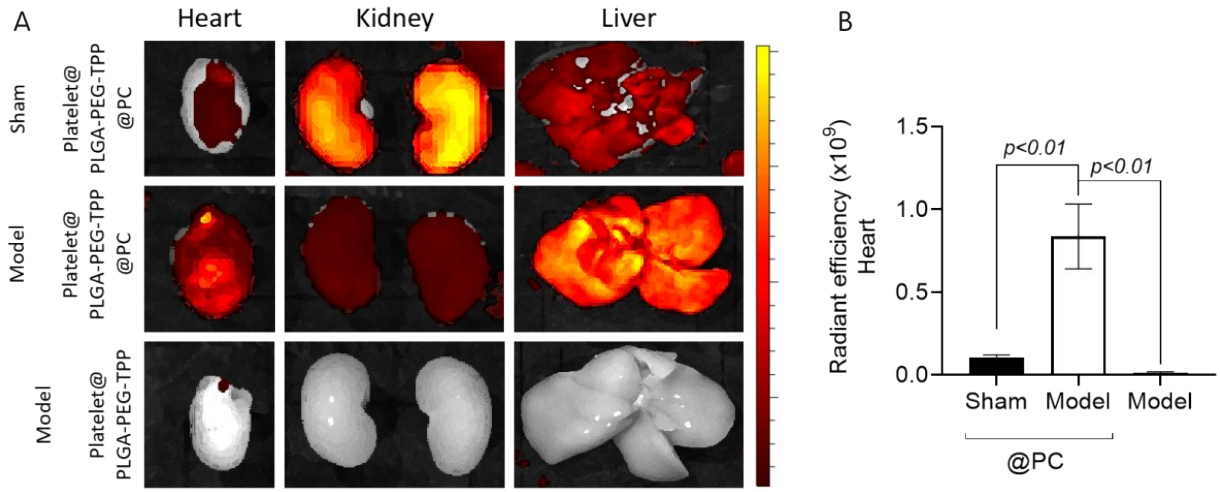
2.2　Platelet@PLGA-PEG-TPP的心脏靶向特征

为验证Platelet@PLGA-PEG-TPP@AST的心脏靶向效果，我们制备了负载染料铝酞菁（Aluminum phthalocyanine chloride，PC）的Platelet@PLGA-PEG-TPP递药体系（Platelet@PLGA-PEG-TPP@PC），并通过尾静脉注射至实验小鼠体内，注射后立刻制备心脏I/R模型；假手术组（Sham）未负载PC的Platelet@PLGA-PEG-TPP作为对照。手术后72 h对各实验组小鼠的心脏、肾脏和肝脏进行影像检测，结果显示，相较于假手术组，模型组（Model）心脏呈现出较高强度的荧光辐射效率，且主要分布于梗死区域（见图3 A-B）。该结果证实，Platelet@PLGA-PEG-TPP@PC能够在心脏损伤后靶向富集在心脏损伤部位，提示Platelet@PLGA-PEG-TPP递药体系具有心脏损伤部位靶向特性。此外，Sham组的肾脏显示出高强度的荧光辐射效率，提示未发生心脏富集的Platelet@PLGA-PEG-TPP可由肾脏排泄。



（A–B）Platelet（血小板膜）、PLGA–PEG–TPP@AST（负载黄芪甲苷的PLGA–PEG–TPP胶束）和Platelet@PLGA–PEG–TPP@AST（负载黄芪甲苷的Platelet@PLGA–PEG–TPP）透射电镜代表图片及粒径分布图，Scar bar：100 nm；（C）Platelet@PLGA–PEG–TPP@AST 0–72 h药物溶出曲线，n=3；（D）Platelet@PLGA–PEG–TPP 0–72 h粒径变化曲线，n=3。

图2　Platelet@PLGA–PEG–TPP@AST表征

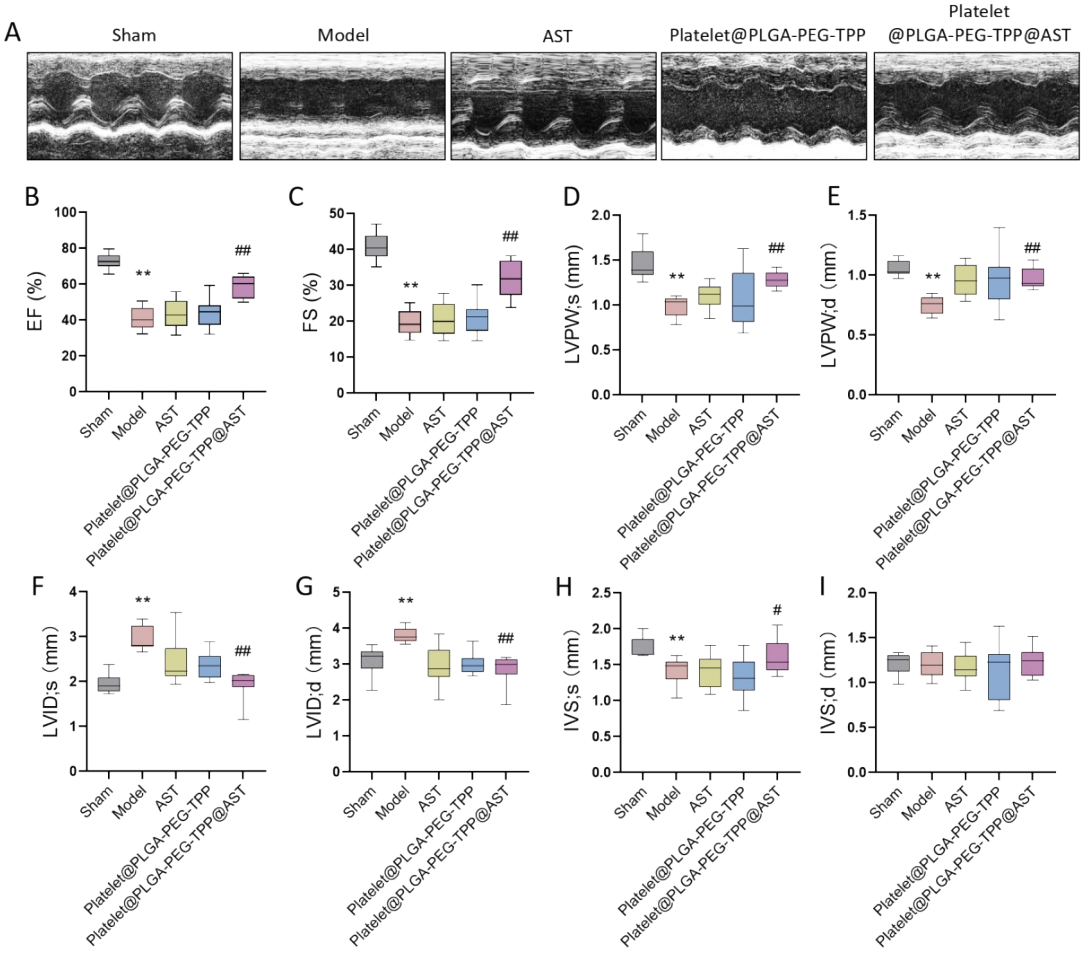


（A）Sham（假手术）—Platelet@PLGA–PEG–TPP@PC、Model（模型）—Platelet@PLGA–PEG–TPP@PC和Model（模型）—Platelet@PLGA–PEG–TPP心脏、肾脏和肝脏活体成像代表图；（B）各实验组心脏荧光辐射效率统计，n=3。

图3　Platelet@PLGA–PEG–TPP的心脏靶向特征

2.3 Platelet@PLGA-PEG-TPP@AST 改善 I/R 后心脏功能

为进一步探索 Platelet@PLGA-PEG-TPP@AST 对 AMI 后心脏损伤的治疗作用，我们通过制备缺血 1 h/再灌注 72 h（I/R）小鼠模型模拟 AMI 后心脏损伤，并分别给予 AST、Platelet@PLGA-PEG-TPP 以及 Platelet@PLGA-PEG-TPP@AST 干预，于 I/R 后 72 h 使用心脏超声评价各实验组心脏功能。结果显示，相较于Model组，Platelet@PLGA-PEG-TPP@AST 能够改善左心室壁运动状态；并显著提高 EF% 和 FS%；而 AST 和 Platelet@PLGA-PEG-TPP 并未改善 I/R 小鼠心脏射血功能（见图 4 A-C）。此外，Platelet@PLGA-PEG-TPP@AST 显著改善了左心室收缩和舒张末期后壁和室间隔厚度，缩小了心室腔内径，而 AST 和 Platelet@PLGA-PEG-TPP 并无该效果（见图 4 D-I）。综上结果，负载黄芪甲苷的 Platelet@PLGA-PEG-TPP 递药体系具有较好的心脏保护活性，能够改善 I/R 导致的心脏功能降低。

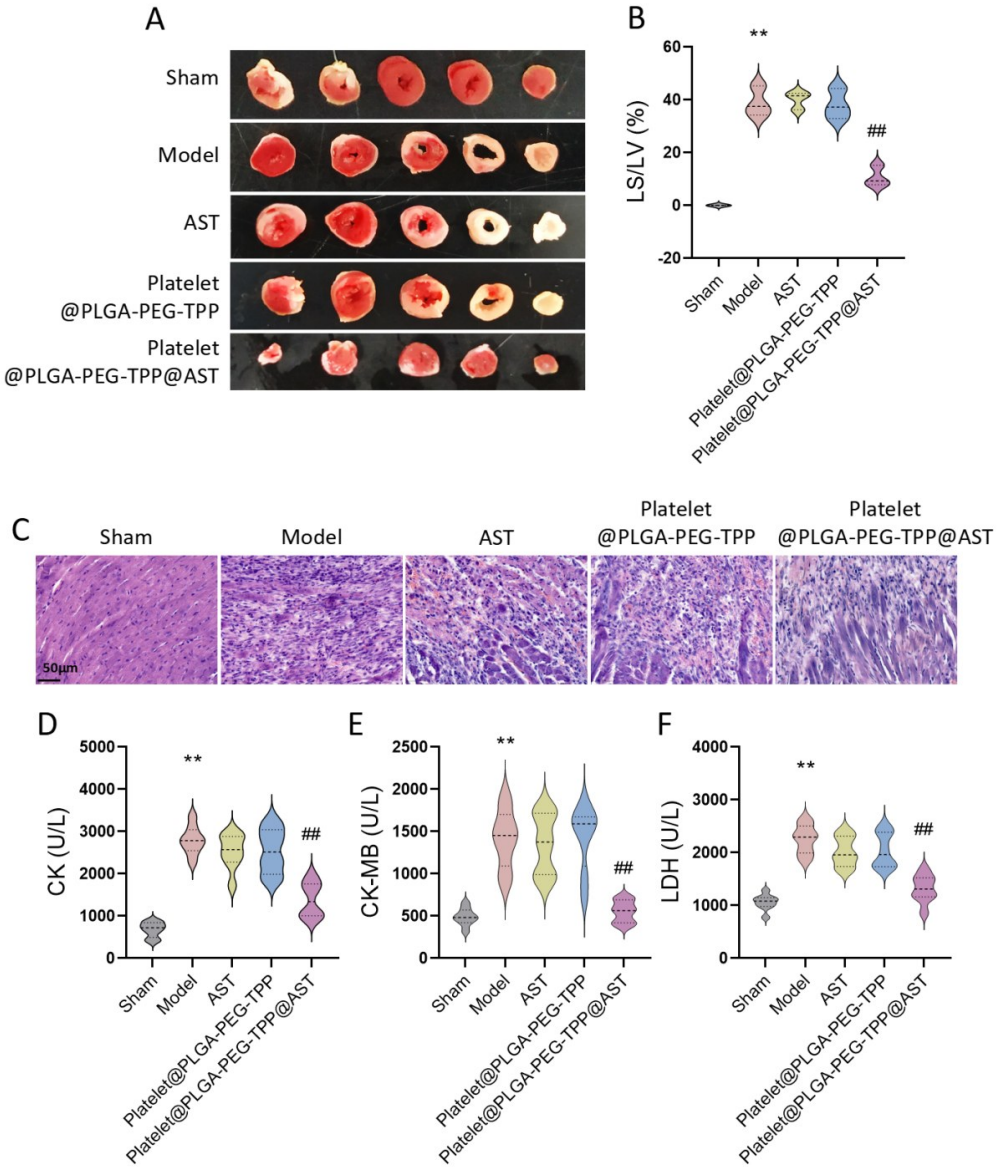


（A）各实验组小鼠 M-Mode 超声心动代表图像；（B-I）EF%（射血分数）、FS%（短轴缩短率）、LVPW;s（收缩期左室后壁厚度）、LVPW;d（舒张期左室后壁厚度）、LVID;s（左心室收缩末期内径）、LVID;d（左心室舒张末期内径）、IVS;s（收缩期室间隔厚度）和 IVS;d（舒张期室间隔厚度）定量分析，n=9。$^{**}P$<0.01 *vs* Sham；$^{\#}P$<0.05 *vs* Model；$^{\#\#}P$<0.01 *vs* Model。

图 4 Platelet@PLGA-PEG-TPP@AST 改善 I/R 后心脏功能

2.4 Platelet@PLGA-PEG-TPP@AST 改善 I/R 后心脏损伤

随后，我们使用 TTC 染色法对各实验组心脏梗死面积进行了分析，结果显示，Platelet@PLGA-PEG-TPP@AST 显著减少了 AMI 后心脏梗死面积，而 AST 和 Platelet@PLGA-PEG-TPP 并无该效果（见图 5 A-B）。心脏横切面的 H&E 染色结果显示，相较于 AST 和 Platelet@PLGA-PEG-TPP，Platelet@PLGA-PEG-TPP@AST 改善了 I/R 导致的心肌细胞坏死和白细胞浸润（见图 5 C）。血清酶学检测具有相一致的结果，即相较于 AST 和 Platelet@PLGA-PEG-TPP，Platelet@PLGA-PEG-TPP@AST 显著改善了血清中 CK、CK-MB 和 LDH 的含量（见图 5 D-F）。综上结果，负载黄芪甲苷的 Platelet@PLGA-PEG-TPP 递药体系能够显著改善 I/R 心脏损伤。

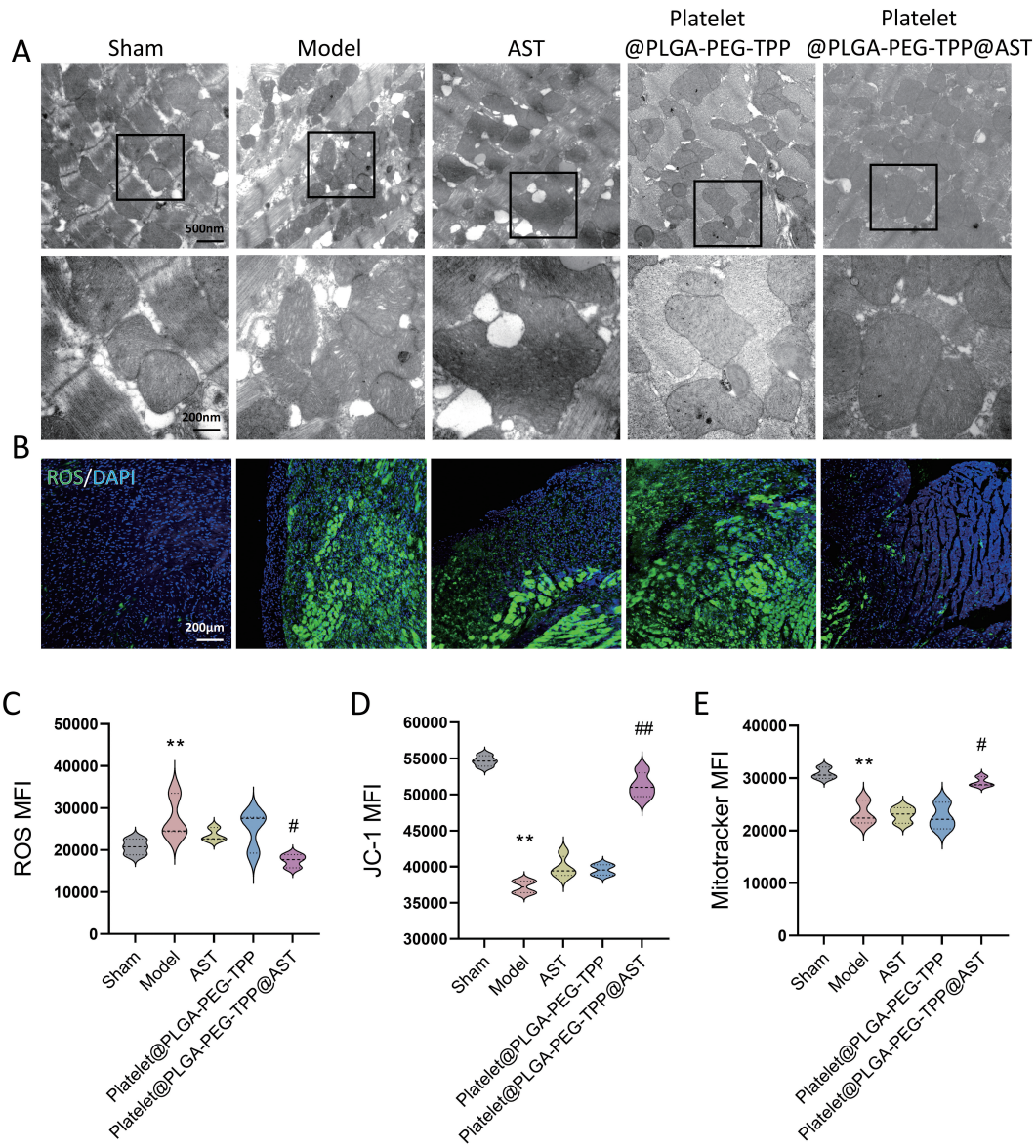


（A–B）各实验组心脏TTC染色代表图及梗死面积定量（LS：梗死面积；LV：心脏面积），n=3；（C）各实验组心脏横切面H&E染色代表图，Scar bar=50 μm；（D–F）各实验组血清CK（肌酸激酶）、CK-MB（肌酸激酶同工酶）和LDH（乳酸脱氢酶）的定量，n=8。$^{**}P$<0.01 *vs* Sham；$^{\#\#}P$<0.01 *vs* Model。

图5　Platelet@PLGA-PEG-TPP@AST改善I/R后心脏损伤

2.5　Platelet@PLGA-PEG-TPP@AST改善I/R后线粒体损伤

由于Platelet@PLGA-PEG-TPP能够靶向“心脏-线粒体”发挥治疗功效，因此，我们对心肌线粒体功能进行了分析。透射电镜展示了各实验组心脏线粒体结构，Platelet@PLGA-PEG-TPP@AST能够促进I/R的心肌线粒体有序排布，改善线粒体水肿，保护线粒体脊结构，而AST和Platelet@PLGA-PEG-TPP并无明显线粒体保护活性（见图6 A）。随后，我们使用ROS荧光探针对心脏横切面的冰冻切片进行了染色，结果显示，相较于AST和Platelet@PLGA-PEG-TPP，Platelet@PLGA-PEG-TPP@AST能够显著抑制I/R导致的心肌细胞内ROS含量上升（见图6 B）。随后，我们提取并纯化了各实验组的心肌线粒体，并对其ROS含量、膜电位（JC-1探针）和线粒体活性（Mitotracker探针）进行了定量分析，结果显示，Platelet@PLGA-PEG-TPP@AST能够显著改善I/R导致的ROS产生、线粒体膜电位和线粒体活性降低，而AST和Platelet@PLGA-PEG-TPP并无明显改善作用（见图6 C–E）。综上结果，负载黄芪甲苷的Platelet@PLGA-PEG-TPP递药体系能够靶向心肌线粒体，并显著改善I/R后的心肌线粒体损伤。



（A）各实验组心肌透射电镜代表图片，Scar bar=200、500 nm；（B）各实验组心脏横切面ROS荧光探针染色代表图片，Scar bar=200 μm；（C-E）各实验组心脏线粒体ROS、JC-1和Mitotracker荧光强度定量分析，n=6。$^{**}P$<0.01 *vs* Sham；$^{\#}P$<0.05 *vs* Model；$^{\#\#}P$<0.01 *vs* Model。

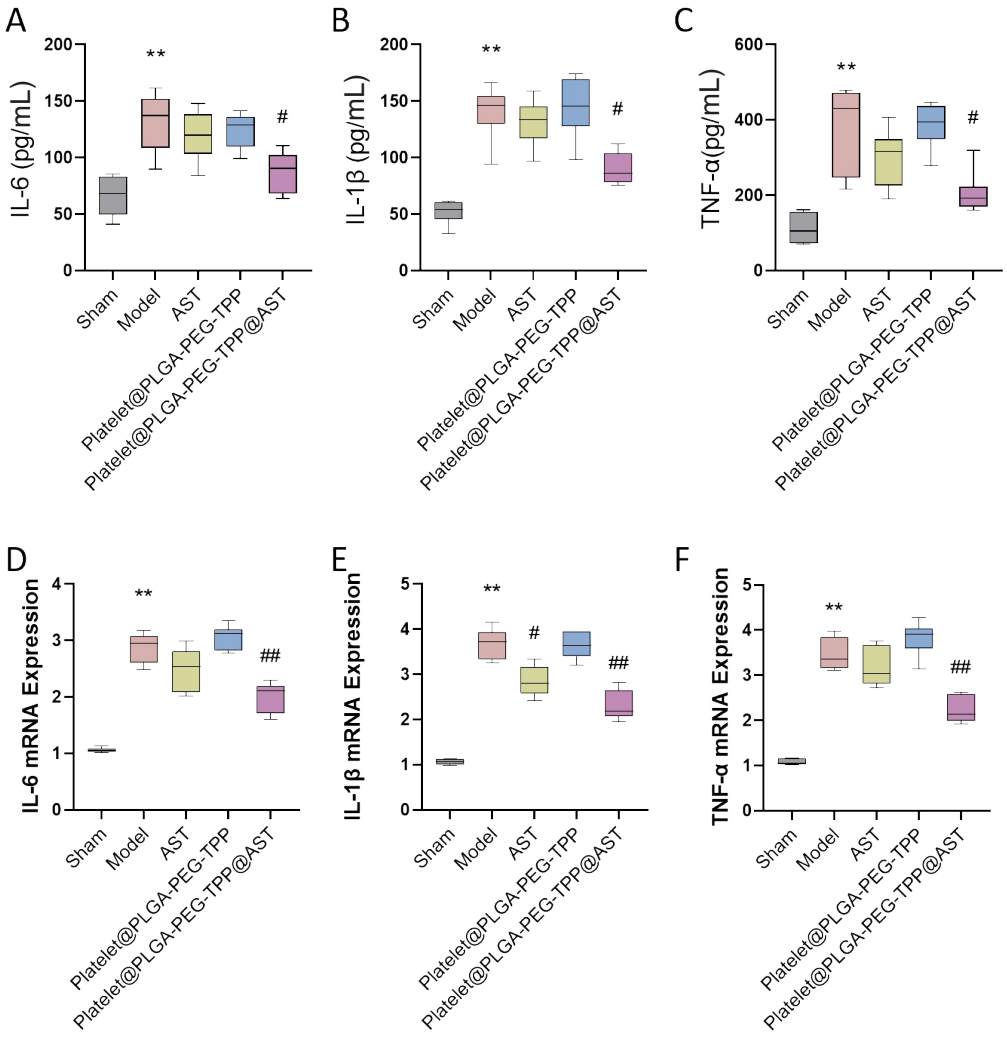
图6 Platelet@PLGA-PEG-TPP@AST改善I/R后线粒体损伤

2.6 Platelet@PLGA-PEG-TPP@AST改善I/R后炎症水平

高水平的线粒体ROS可诱导炎症反应增强[19]，因此，我们对各实验组小鼠血清炎症因子水平进行了考察。血清Elisa结果显示，Platelet@PLGA-PEG-TPP@AST可显著降低I/R诱导的血清炎症因子IL-6、IL-1β和TNF-α水平升高，而AST和Platelet@PLGA-PEG-TPP并无明显改善作用（见图7 A-C）。心脏内炎症因子的mRNA水平反映出相似的趋势，游离黄芪甲苷仅可显著改善心脏中IL-1β的mRNA水平，而Platelet@PLGA-PEG-TPP@AST可显著降低IL-6、IL-1β和TNF-α的mRNA水平。该结果提示，负载黄芪甲苷的Platelet@PLGA-PEG-TPP递药体系可通过靶向抑制线粒体ROS改善I/R后炎症反应。

3 讨论

心肌线粒体损伤是导致AMI后心脏功能降低的关键病理环节之一[20]，靶向心肌线粒体的治疗策略已成为当前心血管领域的研究热点。近年来，使用亲脂性阳离子，如TPP、DQA、七甲碱染料、环金属化铱配合物和罗丹明衍生物等，修饰的聚合物纳米胶束，可实现小分子药物的线粒体靶向递送[17]。TPP在机体内具有良好的稳定性，且其合成和纯化



（A–C）各实验组血清中IL-6（白介素6）、IL-1β（白介素1β）和TNF-α（肿瘤坏死因子α）含量定量分析，n=7，（D–F）心脏组织中IL-6、IL-1β和TNF-α的mRNA表达，n=3；$^{**}P$<0.01 *vs* Sham；$^{\#}P$<0.05 *vs* Model；$^{\#\#}P$<0.01 *vs* Model。

图7　Platelet@PLGA-PEG-TPP@AST改善I/R后炎症水平

过程相对简单，故TPP常被用于线粒体靶向聚合物纳米胶束的表面修饰。此外，在诸多具有线粒体靶向效应的亲脂性阳离子中，TPP对聚合物材料的性质和功能干扰最小。TPP具有较低的生物毒性，可安全应用于心脏、肝脏和肾脏等疾病的线粒体靶向治疗[8]。研究证实，使用包含TPP的聚合物纳米胶束可采用口服、静脉或腹腔等多种途径给药，这些胶束会迅速进入靶器官内的线粒体。例如，Sean Marrache等[21]使用包含末端TPP的PLGA-b-PEG聚合物制备了多种线粒体靶向制剂，姜黄素、线粒体解偶联剂2, 4-二硝基苯酚（2, 4-DNP）、lonidamine和α-生育酚琥珀酸酯（α-TOS）被加载至该药物输送系统中，并应用于阿尔茨海默病、肥胖症和癌症的线粒体靶向治疗。该系列结果证明了这种药物递送的适用性，与非线粒体靶向聚合物纳米胶束或游离形式的药物相比，具有线粒体靶向功能的聚合物纳米胶束具有更为显著的治疗效果[21]。

黄芪甲苷是中药黄芪的主要活性成分之一，现代药理学研究证实其能够提高心肌能量代谢、抑制心肌细胞凋亡、改善心肌肥厚及纤维化等[22]。但由于黄芪甲苷具有低水溶性特征，口服生物利用度较低[16]，采用传统方式给药会极大的限制黄芪甲苷的临床作用效果。本课题组致力于建立中药有效单体的创新递药系统，曾使用负载黄芪甲苷的可心脏注射水凝胶治疗心肌梗死[16]，由于该体系具有损伤部位原位给药和缓释特征，极大的提高了黄芪甲苷对心肌梗死的治疗效果。然而，使用负载药物的心脏注射水凝胶对给药操作、水凝胶的预混制备等方面要求较高，限制了该体系的临床应用前景。同时，我们另外多项研究证实了，负载人参皂苷Rg3的聚

合物纳米胶束可显著提高Rg3的心脏治疗活性，且由于聚合物纳米胶束具有制备方式相对简单、缓释和稳定性较高的特点[13, 14]，使用聚合物纳米胶束装载有效中药单体的药物递送方式具有更大的临床应用潜力。由于PLGA-b-PEG聚合物是FDA批准的药用聚合物胶束，因此，在本实验中我们使用末端包含TPP的PLGA-b-PEG聚合物胶束作为药物递送的主要载体。我们采用纳米沉淀法合成了负载黄芪甲苷的PLGA-PEG-TPP纳米胶束，该体系具有易制备和稳定性高的特点，且克服了黄芪甲苷由于其亲脂性特征而导致的生物利用度较低，并同时具有线粒体主动靶向功能。

如何解决聚合物纳米胶束的心脏靶向性仍是需要深入探索的课题。应用靶向肽修饰聚合物纳米胶束的心脏主动靶向药物递送方式，已被证实其不具备稳定的心脏靶向作用[23]。血小板由于其促凝血功能，可在心肌梗死后归巢至心脏受损部位，具有心脏靶向的生物学特征[15]。因此，使用血小板膜修饰聚合物纳米胶束可实现心肌梗死后的心脏靶向药物递送，且相较于靶向肽易诱发心脏免疫性损伤，血小板膜具有更高的安全性。在本实验中，为验证该体系的心脏靶向效果，我们使用染料铝酞菁代替AST被负载于Platelet@PLGA-PEG-TPP中，活体成像实验证实手术后72 h，模型组相较于假手术组心脏呈现出较高强度的荧光辐射效率，且主要分布于梗死区域，该结果证实了，该载药体系具有心脏损伤部位靶向特性，可在心脏损伤后靶向富集在心脏损伤部位。随后，我们使用心脏超声、TTC染色、心肌酶学和组织学染色评价和对比了游离AST和负载AST的Platelet@PLGA-PEG-TPP对心脏功能和心肌损伤的影响。负载AST的Platelet@PLGA-PEG-TPP相较于游离AST显著改善了I/R诱发的心脏功能降低、心肌梗死和心肌损伤，提示本研究中开发的药物递送体系可显著提高AST的心脏保护活性。在本研究中，我们在运用血小板膜实现心脏靶向的同时，运用包含末端TPP的PLGA-b-PEG聚合物以实现对心肌线粒体的靶向作用。因此，我们对心肌线粒体功能进行了分析。我们通过对线粒体结构、线粒体膜电位以及ROS水平开展研究，结果证实了Platelet@PLGA-PEG-TPP可以提升AST对I/R后的心肌线粒体损伤的改善作用，以及线粒体损伤诱发的心脏炎症。综上结果显示，制备的“心脏—线粒体”双靶向药物递送体系可显著提高AST的心脏保护活性，该体系可为中药新药的开发提供创新策略和方法。

4 结论

在本实验中，我们制备了一种血小板膜修饰的PLGA-b-PEG-TPP聚合物纳米胶束来包裹黄芪甲苷（Platelet@PLGA-PEG-TPP@AST），静脉注射该纳米胶束可实现靶向心脏受损区域心肌线粒体递送黄芪甲苷，该体系实现了“器官—亚细胞器”双重靶向功效。药效学实验证实了使用Platelet@PLGA-PEG-TPP@AST可显著提高游离黄芪甲苷的心脏和线粒体保护活性。该实验提供了一种疏水性中药活性单体的递送方式，可解决疏水性中药活性单体组织生物利用度低的问题，具有较大的临床应用潜力。

参考文献

[1] REED G W, ROSSI J E, CANNON C P. Acute myocardial infarction[J]. Lancet, 2017, 389(10065): 197-210.

[2] 中国心血管健康与疾病报告编写组, 胡盛寿. 中国心血管健康与疾病报告2020概要[J]. 中国循环杂志, 2021, 36(6): 25.

[3] WU J H, HALL M, DONDO T B, et al. Association between time of hospitalization with acute myocardial infarction and in-hospital mortality[J]. European Heart Journal, 2019, 40(15): 1214-1221.

[4] ZANG Y B, WAN J J, ZHANG Z, et al. An updated role of astragaloside IV in heart failure[J]. Biomed Pharmacother, 2020, 126: 110012.

[5] JIANG M M, NI J Y , CAO Y L, et al. Astragaloside IV attenuates myocardial ischemia-reperfusion injury from oxidative stress by regulating succinate, lysophospholipid metabolism, and ros scavenging system[J]. Oxidative Medicine and Cellular Longevity, 2019, 2019: 9137654.

[6] EL-HATTAB A W, SCAGLIA F. Mitochondrial cytopathies[J]. Cell Calcium, 2016, 60(3): 199-206.

[7] WANG Z J, GUO W L, KUANG X, et al. Nanopreparations for mitochondria targeting drug delivery system: Current strategies and future prospective [J]. Asian Journal of Pharmaceutical Sciences, 2017, 12 (6): 498-508.

[8] SUN Y J, YANG Q S, XIA X, et al. Polymeric nanoparticles for mitochondria targeting mediated robust cancer therapy[J]. Frontiers in Bioengineering and

Biotechnology, 2021, 9: 755727.

[9] KLOEPPING K C, KRAUS A S, HEDLUND D K, et al. Triphenylphosphonium derivatives disrupt metabolism and inhibit melanoma growth in vivo when delivered via a thermosensitive hydrogel[J]. PloS one, 2020, 15(12): e0244540.

[10] OUPICKY D, OGRIS M, HOWARD K A, et al. Importance of lateral and steric stabilization of polyelectrolyte gene delivery vectors for extended systemic circulation[J]. Molecular Therapy, 2002, 5(4): 463-472.

[11] LOCATELLI E, FRANCHINI M C. Biodegradable PLGA-b-PEG polymeric nanoparticles: synthesis, properties, and nanomedical applications as drug delivery system[J]. Journal of Nanoparticle Research, 2012, 14 (12): 1-17.

[12] SENA OZBAY H, YABANOGLU-CIFTCI S, BAYSAL I, et al. Mitochondria-targeted CoQ10 loaded PLGA-b-PEG-TPP nanoparticles: Their effects on mitochondrial functions of COQ8B-/- HK-2 cells[J]. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, 2022, 173: 22-33.

[13] LI L, WANG Y L, GUO R, et al. Ginsenoside Rg3-loaded, reactive oxygen species-responsive polymeric nanoparticles for alleviating myocardial ischemia-reperfusion injury[J]. Journal of Controlled Release, 2020, 317: 259-272.

[14] LAN L, NI J, MIN L, et al. Ginsenoside Rg3 micelles mitigate doxorubicin-induced cardiotoxicity and enhance its anticancer efficacy[J]. Drug Delivery, 2017, 24(1): 1617-1630.

[15] ZHUANG J, GONG H, ZHOU J, et al. Targeted gene silencing in vivo by platelet membrane-coated metal-organic framework nanoparticles[J]. Sci Adv, 2020, 6 (13): eaaz6108.

[16] CHEN J, HAN X, DENG J, et al. An injectable hydrogel based on phenylboronic acid hyperbranched macromer encapsulating gold nanorods and Astragaloside IV nanodrug for myocardial infarction[J]. Chemical Engineering Journal, 2020, 413: 127423.

[17] SMITH R A, HARTLEY R C, MURPHY M P. Mitochondria-targeted small molecule therapeutics and probes[J]. Antioxidants & Redox Signaling, 2011, 15 (12): 3021-3038.

[18] MAULER M, HERR N, SCHOENICHEN C, et al. Platelet serotonin aggravates myocardial ischemia/reperfusion injury via neutrophil degranulation[J]. Circulation, 2019, 139(7): 918-931.

[19] ZHAO M, WANG Y Z, LI L, et al. Mitochondrial ROS promote mitochondrial dysfunction and inflammation in ischemic acute kidney injury by disrupting TFAM-mediated mtDNA maintenance[J]. Theranostics, 2021, 11 (4): 1845-1863.

[20] RAMACHANDRA C J A, HERNANDEZ-RESENDIZ S, CRESPO-AVILAN G E, et al. Mitochondria in acute myocardial infarction and cardioprotection[J]. EBioMedicine, 2020, 57: 102884.

[21] MARRACHE S, DHAR S. Engineering of blended nanoparticle platform for delivery of mitochondria-acting therapeutics[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2012, 109(40): 16288-16293.

[22] 孔祥琳, 吕琴, 李运伦, 等. 黄芪甲苷对心脑血管疾病的现代药理作用研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志, 2021, 27(2): 6.

[23] MIRAGOLI M, CERIOTTI P, IAFISCO M, et al. Inhalation of peptide-loaded nanoparticles improves heart failure[J]. Sci Transl Med, 2018, 10(424): eaan6205.

·作者与读者·

封面故事

黄芪甲苷是中药黄芪主要活性成分之一，现代药理学已证明其具有改善心脏功能，抑制心脏氧化应激损伤，抗炎等心血管活性。然而，由于黄芪甲苷的疏水性特征致使其生物利用度较低，严重限制了黄芪甲苷的临床治疗效果，这引起了樊官伟教授的关注。为解决这一问题，樊官伟教授团队设计了可用于递送黄芪甲苷的脂质壳结构纳米靶向递送系统。该系统的脂质壳由血小板膜构成，致使其具备了梗死心脏主动靶向性，而纳米胶束外壳使用了线粒体靶向特性的TPP阳离子修饰，从"器官—细胞器"层面实现"心脏—线粒体"的双重靶向递药功效。实验结果显示，该递药系统显著提高了黄芪甲苷的心脏保护活性，并为中药科技创新和为新药开发提供新策略和新方法。