

银纳米颗粒-S-亚硝基谷胱甘肽胶囊治疗辐射-诱导肠炎小鼠模型肠道感染的活性研究[△]

卡斯木·卡哈尔^{1*}, 阿依努尔·吐鲁洪², 阿迪力·阿不都热合曼^{3#} (1. 新疆医科大学第一附属医院药学部, 乌鲁木齐 830054; 2. 新疆医科大学第一附属医院昌吉分院药学部, 新疆 昌吉 831100; 3. 新疆医科大学药学院, 乌鲁木齐 830017)

中图分类号 R96 文献标志码 A 文章编号 1672-2124(2025)05-0539-06

DOI 10.14009/j.issn.1672-2124.2025.05.006



摘要 目的:探讨银纳米颗粒-S-亚硝基谷胱甘肽(Ag-GSNO NPs)胶囊治疗辐射-诱导肠炎小鼠模型肠道感染的活性。方法:合成S-亚硝基谷胱甘肽(GSNO)并制备Ag-GSNO NPs胶囊。(1)通过菌落形成单位计数测定GSNO粉末或Ag-GSNO NPs粉末对金黄色葡萄球菌的抑菌能力;通过细胞增殖能力测定法测定GSNO粉末或Ag-GSNO NPs粉末对人结肠腺癌细胞的体外细胞毒性,实验分组为Con组、GSNO组和Ag-GSNO NPs组。(2)通过一氧化氮(NO)分析仪检测GSNO粉末或Ag-GSNO NPs粉末产生NO的能力,实验分组为GSNO组和Ag-GSNO NPs组。(3)将40只6~8周龄SPF级C57BL/6雄性小鼠,随机分为Control组(给予小鼠假辐射)、Model组(建立辐射-诱导肠炎小鼠模型)、Model+GSNO组(建模小鼠辐射后立即口服管饲法给予GSNO胶囊7 μg,并在随后连续3 d口服管饲法给予GSNO胶囊7 μg)、Model+Ag-GSNO NPs组(建模小鼠辐射后立即口服管饲法给予Ag-GSNO NPs胶囊10 μg,并在随后连续3 d口服管饲法给予Ag-GSNO NPs胶囊10 μg)。从建模当日(第0日)开始至第4日监测小鼠体重。第4日颈椎脱臼法处死小鼠,采集小鼠空肠组织制备石蜡组织切片,进行苏木精-伊红染色及组织病理学分析。采用酶联免疫吸附试验测定小鼠静脉血清炎症因子肿瘤坏死因子α(TNF-α)、白细胞介素(IL)1β、IL-6和高迁移率蛋白B1(HMGB1)的水平。结果:(1)与Con组比较,GSNO组和Ag-GSNO NPs组菌落形成单位数降低,差异有统计学意义($P<0.05$),三组细胞增殖能力的差异无统计学意义($P>0.05$)。(2)Ag-GSNO NPs组在1、2、4、8、12和24 h生成的NO量均高于GSNO组,差异均有统计学意义($P<0.05$)。(3)第0日,Control组、Model组、Model+GSNO组和Model+Ag-GSNO NPs组小鼠体重的差异均无统计学意义($P>0.05$)。第4日,与Control组比较,Model组、Model+GSNO组和Model+Ag-GSNO NPs组小鼠体重降低,空肠组织绒毛高度和绒毛宽度、隐窝深度和隐窝数量降低,血清炎症因子TNF-α、IL-1β、IL-6和HMGB1水平升高,差异均有统计学意义($P<0.05$);Model+Ag-GSNO NPs组小鼠体重,空肠组织绒毛高度、绒毛宽度、隐窝深度和隐窝数量高于Model组和Model+GSNO组,血清炎症因子TNF-α、IL-1β、IL-6和HMGB1水平低于Model组和Model+GSNO组,差异均有统计学意义($P<0.05$)。结论:Ag-GSNO NPs胶囊治疗辐射-诱导肠炎小鼠模型肠道感染的活性优于单纯GSNO粉剂胶囊,并能降低模型小鼠血清炎症因子水平。

关键词 银纳米颗粒; S-亚硝基谷胱甘肽; 辐射-诱导肠炎小鼠模型; 一氧化氮; 抗菌活性

Activity of Silver-S-Nitrosoglutathione Nanoparticles Capsules in the Treatment of Intestinal Infection in Mouse Model with Radiation-Induced Enteritis[△]

KASIMU Kahaer¹, AYINUER Tuluhong², ADILI Abudureheman³ (1. Dept. of Pharmacy, the First Affiliated Hospital of Xinjiang Medical University, Urumqi 830054, China; 2. Dept. of Pharmacy, Changji Branch of the First Affiliated Hospital of Xinjiang Medical University, Urumqi 831100, China; 3. College of Pharmacy, Xinjiang Medical University, Urumqi 830017, China)

ABSTRACT **OBJECTIVE:** To probe into the activity of silver-S-nitrosoglutathione nanoparticles (Ag-GSNO NPs) capsules in the treatment of intestinal infection in mouse model with radiation-induced enteritis. **METHODS:** GSNO was synthesized and Ag-GSNO NPs capsules were prepared. (1) The antibacterial ability of GSNO powder or Ag-GSNO NPs powder against *Staphylococcus aureus* was determined by colony forming unit counting, the *in vitro* cytotoxicity of GSNO powder or Ag-GSNO NPs powder on human colon adenocarcinoma cells was determined by the cell proliferative capacity assay. The experiments were divided into the Con group, GSNO group and Ag-GSNO NPs group. (2) The ability of GSNO powder or Ag-GSNO NPs powder to produce nitric oxide (NO) was analyzed by NO analyzer, the experiments were grouped into GSNO group and Ag-GSNO NPs group. (3) A total of 40 SPF-grade C57BL/6 male mice aged 6 to 8 weeks were randomly divided into Control group (mice were given sham radiation), Model group (radiation-induced enterocolitis mouse model was established), Model+GSNO group (modeled mice were

△ 基金项目:新疆维吾尔自治区自然科学基金资助项目(No. 2023D01C403)

* 主管药师,硕士。研究方向:药理学。E-mail:tuan392@sina.com

通信作者:讲师,博士。研究方向:心血管药理及分子药理学。E-mail:39674971@qq.com

given GSNO capsules 7 μg by oral tube feeding right after irradiation, and giving GSNO capsules 7 μg by oral tube feeding for the next 3 consecutive days) and Model+Ag-GSNO NPs group (modeled mice were given Ag-GSNO NPs capsules 10 μg by oral tube feeding right after irradiation, and given Ag-GSNO NPs capsules 10 μg by oral tube feeding for the next 3 consecutive days). Mice weight was monitored from the day of modeling (day 0) to the fourth day. On the fourth day, mice were executed by cervical dislocation method, jejunal tissue was collected to prepare paraffin tissue sections for hematoxylin-eosin staining and histopathological analysis. Enzyme-linked immunosorbent assay was used to determine venous serum inflammatory factors levels including tumor necrosis factor α (TNF- α), interleukin (IL)-1 β , IL-6 and high mobility group protein B1 (HMGB1). RESULTS: (1) Compared with Con group, the number of colony-forming units was lower in GSNO group and Ag-GSNO NPs group, with statistically significant differences ($P<0.05$), while the differences in cell proliferative capacity among three groups was not statistically significant ($P>0.05$). (2) The amounts of NO production were higher in Ag-GSNO NPs group than those in GSNO group at 1 h, 2 h, 4 h, 8 h, 12 h and 24 h, with statistically significant differences ($P<0.05$). (3) On day 0, there were no statistically significant differences in body weights of mice among Control group, Model group, Model+GSNO group and Model+Ag-GSNO NPs group ($P>0.05$). On the fourth day, compared with Control group, mice in Model group, Model+GSNO group and Model+Ag-GSNO NPs group had lower body weights, lower villus heights, villus widths, crypt depths and crypt numbers in jejunal tissue, higher serum inflammatory factors levels including TNF- α , IL-1 β , IL-6 and HMGB1, all with statistically significant differences ($P<0.05$), mice in Model+Ag-GSNO NPs had higher body weights, villus heights, villus widths, crypt depths and crypt numbers in jejunal tissue, lower serum inflammatory factors levels including TNF- α , IL-1 β , IL-6 and HMGB1 than those in Model group and Model+GSNO groups, all with statistically significant differences ($P<0.05$). CONCLUSIONS: The activity of Ag-GSNO NPs capsules in the treatment of intestinal infections in mouse model with radiation-induced enteritis is superior to that of GSNO powder capsules alone, which can reduced the serum inflammatory factor levels in model mice. **KEYWORDS** Silver nanoparticles; S-nitrosoglutathione; Model mice with radiation-induced enteritis; Nitric oxide; Antibacterial activity

对于腹部和骨盆恶性肿瘤,放疗仍然是主要的临床治疗方法之一,>70%的恶性肿瘤患者接受过放疗。然而,胃肠细胞对电离辐射很敏感,放射性肠炎是放疗的主要不良反应之一^[1-2]。肠道壁完整性的破坏会影响消化、吸收和运输;辐射损害肠道壁完整性,导致杂菌进入肠道壁内部,引起炎症,最终损害多个器官^[3]。一氧化氮(NO)是一种在生物系统中起关键作用的内源性自由基气体。由于其体积小、带中性电荷、相对亲脂性,即使在没有通道或受体的情况下,也能通过细胞膜,向细胞内扩散^[4]。NO通过活性氮表现出重要的浓度依赖性广谱抗病原体活性,其作用机制不受细菌耐药性的影响。然而,气态NO的半衰期极短,仅3~4 s,严重限制了其在抗菌治疗中的应用。NO以C-S-NO模式与化合物的硫原子共价结合,并可在S-N键的异裂或均裂裂解过程中释放^[5]。S-亚硝基谷胱甘肽(GSNO)属于哺乳动物三硝酸甘油-S-亚硝基硫醇类物质,已被证实是有效的内源性持续性NO供体和载体^[6]。银纳米颗粒(Ag NPs)可以与亚硝基硫醇相互作用,具有潜在催化GSNO分解和产生NO的作用^[7]。本研究拟通过体外和在体建立辐射-诱导肠炎小鼠模型实验,研究银纳米颗粒-S-亚硝基谷胱甘肽(Ag-GSNO NPs)的特性,探讨其治疗辐射-诱导肠炎小鼠模型的疗效。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物:40只6~8周龄无特定病原体(SPF)级C57BL/6雄性小鼠,体重为23~26 g,购自新疆医科大学实验动物中心。小鼠饲养于恒温(22~25℃)、恒湿(55%~70%)、配备12 h/12 h光照/黑暗循环的标准SPF级鼠房。5只小鼠

1个鼠笼,小鼠饲喂标准啮齿类动物饲料,可以自由采食和饮水。在小鼠建模之前,先适应性饲养1周。所有动物实验均严格按照美国国立卫生研究院的《实验动物护理与使用指南》进行,并经新疆医科大学第一附属医院实验动物伦理委员会批准(伦理批号:20231016137)。

1.1.2 细胞:人结肠腺癌细胞(Caco-2)购自武汉普诺赛生命科技有限公司(批号:PCH3201254);金黄色葡萄球菌(*S. aureus*)购自美国ATCC细胞库(批号:SAB7110832564)。

1.1.3 仪器:NOA280i型NO分析仪(美国Sievers Instruments公司);MultiRad 225型辐射仪(美国Faxitron公司)。

1.1.4 药品与试剂:Ag NPs(批号:AN24357)、还原型谷胱甘肽(批号:AP23746)和亚硝酸钠(NaNO_2 ,批号:AC23612)购自上海阿拉丁生化科技股份有限公司;RPMI-1640细胞培养基干粉(批号:IN30852246)、胎牛血清(批号:HY33251)购自美国Thermo Fisher Scientific公司;LB肉汤培养基干粉(批号:B4518-6)购自北京百奥莱博科技有限公司;苏木精-伊红(HE)染色液套装(批号:H12826)购自北京索莱宝科技有限公司;细胞增殖能力测定(CCK-8)试剂盒(批号:CC7246-71)购自上海碧云天生物技术股份有限公司。

1.2 方法

1.2.1 GSNO的合成:将等摩尔浓度(200 mmol/L)的还原型谷胱甘肽和 NaNO_2 在0.5 mol/L盐酸中混合生成GSNO。合成的GSNO粗混合物在冰浴中避光搅拌45 min,然后用丙酮沉淀。沉淀物过滤后,分别用4℃预冷的冷水5 mL、丙酮1 mL和乙烷1 mL洗涤3次。随后将沉淀物冷冻干燥过夜,制成GSNO粉末,并避光保存^[8]。

1.2.2 Ag-GSNO NPs 的制备:将 70 g/mL 的 GSNO 悬浮液 1 mL 与 30 g/mL 的 Ag NPs 悬浮液 1 mL 混合。然后加入丙酮进行沉淀,随后过滤沉淀的混合物,在 4 ℃ 下用预冷水、丙酮和乙烷分别洗涤 1 次。冷冻干燥过夜,制备 Ag-GSNO NPs 粉末^[8]。将 10 μg 上述 Ag-GSNO NPs 粉末(含 7 μg GSNO)或单纯 7 μg GSNO 粉末混合入淀粉粉末,一并装入明胶胶囊壳中,制备 Ag-GSNO NPs 胶囊。

1.2.3 Ag-GSNO NPs 释放 NO 气体的动力学:NO 生成量测定实验分为 2 组,即 GSNO 组和 Ag-GSNO NPs 组,每组 3 个平行重复。使用 NO 分析仪在 25 ℃ 下连续监测 24 h 测量 GSNO 粉末(GSNO 组)或 Ag-GSNO NPs(Ag-GSNO NPs 组)的 NO 气体排放量。将 Ag-GSNO NPs 样品浸泡于 4 mL 磷酸盐缓冲溶液(PBS,pH=7.4)中,在避光的反应容器中维持 37 ℃ 恒温。每 0.5 h 通过起泡器和氮气以 200 mL/min 的速度从反应容器的顶空扫出 NO 气体,并使其转移到分析仪的化学发光检测室。在化学发光检测腔室中,NO 与臭氧反应生成激发态的二氧化氮(NO^{2*})。此激发态的二氧化氮衰变并释放 1 个光子,通过分析仪进行检测。

1.2.4 菌落形成单位的定量:挑取 1 个划线后过夜培养的金黄色葡萄球菌(革兰阳性菌)单菌落,接种至 3 mL LB 肉汤培养基中,在 37 ℃ 下振荡培养过夜。经 UV-vis 光密度测定达到 1.0×10⁶ CFU/mL 以上。然后细菌培养物以 2 500 r/min 室温离心(离心半径为 1.2 m)7 min。弃肉汤,将培养物重悬于 1 mL PBS 溶液中。取 100 μL 此细菌重悬液,分别接种至(1)单纯 3 mL 新鲜 LB 培养液(Con 组)、(2)3 mL 新鲜 LB 培养液+100 μmol/L GSNO(GSNO 组)、(3)3 mL 新鲜 LB 培养液+10 μg Ag-GSNO NPs(Ag-GSNO NPs 组)中,在 37 ℃ 下振荡培养过夜,每组 5 个生物学重复^[9]。次日,细菌培养物以 2 500 r/min 室温离心(离心半径为 1.2 m)7 min。弃肉汤,将培养物重悬于 1 mL PBS 溶液中。以 10 倍梯度稀释上述重悬液,然后铺板 LB 琼脂板,在 37 ℃ 培养箱中培养过夜。次日统计每个培养板中每平方厘米测试环中的 CFU,以确定抑菌效果。

1.2.5 细胞培养:Caco-2 细胞维持培养于补充有 10% 胎牛血清的 RPMI-1640 完全培养液中,置于 37 ℃ 恒温、湿润的 CO₂ 细胞孵育箱中维持培养。

1.2.6 体外细胞毒性测试:细胞实验分为 Con 组、GSNO 组和 Ag-GSNO NPs 组,每组 5 个生物学重复。使用 CCK-8 试剂盒和 24-孔板细胞小室进行测试。将 1.5×10⁵ 个 Caco-2 细胞种于上层细胞小室,下层 24-孔板中按照不同分组,分别添加(1)1 mL 补充有 10% 胎牛血清的 RPMI-1640 完全培养液(Con 组)、(2)1 mL 补充有 10% 胎牛血清的 RPMI-1640 完全培养液+100 μmol/L GSNO(GSNO 组)、(3)1 mL 补充有 10% 胎牛血清的 RPMI-1640 完全培养液+10 μg Ag-GSNO NPs(Ag-GSNO NPs 组)^[9]。置于 37 ℃ 细胞孵育箱中连续培养 48 h。上述 3 个分组细胞全部更换为 1 mL 补充有 10% 胎牛血清的 RPMI-1640 完全培养液,并添加 10 μL CCK-8 试剂,置于 37 ℃ 细胞孵育箱中继续培养 6 h。酶标仪测定 OD 450 nm 波长处的吸光度。细胞增殖能力(%)=GSNO 组或 Ag-GSNO NPs 组细胞 OD 450 nm 吸光度/Con 组细胞 OD 450 nm 吸光度×100%。

1.2.7 辐射-诱导肠炎小鼠模型的建立:使用辐射仪对小鼠进

行单剂量 6.5 Gy(0.99 Gy/min)腹部 X 射线照射。用铅条屏蔽小鼠的头部、胸部和四肢,以防止骨髓的辐射暴露。辐射-诱导肠炎小鼠模型的辐照剂量是通过预实验处理小鼠,观察小鼠随后出现便血的情况,以及采集小鼠空肠组织进行 HE 染色和组织病理学分析,确定空肠组织确实出现明显的绒毛萎缩、隐窝深度变浅、隐窝数量降低的现象,从而进行确定的。正式实验中,以小鼠随后出现便血的情况为建模成功。

1.2.8 在体实验分组及处理方式:将 40 只 C57BL/6 雄性小鼠随机分为 4 组,每组 10 只。(1)Control 组小鼠给予假辐射处理;(2)Model 组小鼠建立辐射-诱导肠炎模型;(3)Model+GSNO 组小鼠建立辐射-诱导肠炎模型,辐射后立即口服管饲法给予 GSNO 胶囊 7 μg,并在随后连续 3 d 采用口服管饲法给予 GSNO 胶囊 7 μg;(4)Model+Ag-GSNO NPs 组小鼠建立辐射-诱导肠炎小鼠模型,辐射后立即口服管饲法给予 10 μg Ag-GSNO NPs 胶囊,并在随后连续 3 d 采用口服管饲法给予 10 μg Ag-GSNO NPs 胶囊。每日监测各组小鼠体重,并于建模后第 4 日,从眼眶静脉丛采集小鼠静脉血,加入肝素抗凝剂抗凝,随后冻存于-80 ℃ 冰箱备用。采用颈椎脱臼法处死小鼠。采集小鼠空肠组织,将 50%的组织浸没于 4%多聚甲醛溶液中固定,另外 50%的组织立即浸入液氮速冻,随后冻存于-80 ℃ 冰箱备用。

1.2.9 HE 染色:取 50%新鲜的小鼠空肠组织,立即浸没于 4%多聚甲醛溶液中,在 4 ℃ 下固定超过 48 h。随后进行石蜡包埋并制备空肠组织石蜡切片(厚度为 5 μm)。使用 HE 染色液套装对石蜡组织切片进行 HE 染色,具体操作按照说明书中的指导进行。光学显微镜下镜检并进行空肠组织病理学分析。

1.2.10 酶联免疫吸附试验(ELISA):将小鼠静脉血在 4 ℃ 下,1 200 r/min 离心(离心半径为 1.2 m)10 min,取上层血清,置于碎冰中备用。使用抗小鼠肿瘤坏死因子 α(TNF-α)、白细胞介素(IL)1β 和 IL-6 ELISA 测定试剂盒进行对应指标的测定,具体操作按照说明书中的指导进行即可。

1.3 统计学方法

采用 GraphPad Prism v8 软件进行统计学分析。计量数据均表示为 $\bar{x} \pm s$ 的形式,两组间比较采用 *t* 检验;多组间比较采用单因素方差分析(one way ANOVA)和事后 Turkey's 多重比较检验;*P*<0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 体外 Ag-GSNO NPs 抑菌能力测试结果

与 Con 组比较,GSNO 组和 Ag-GSNO NPs 组菌落形成单位数降低,差异均有统计学意义(*P*<0.05),见表 1。

表 1 体外抑菌能力测定结果($\bar{x} \pm s, n=5$)

组别	菌落形成单位/(CFUs/cm ²)
Con 组	1.42×10 ⁸ ±1.30×10 ⁸
GSNO 组	5.10×10 ⁶ ±7.21×10 ^{6a}
Ag-GSNO NPs 组	3.40×10 ⁴ ±2.24×10 ^{4a}
<i>F</i>	437.2
<i>P</i>	<0.000 1

注:与 Con 组相比,**P*<0.05。

2.2 体外 Ag-GSNO NPs 的细胞毒性测试结果

Con 组、GSNO 组和 Ag-GSNO NPs 组细胞增殖能力的差异

无统计学意义 ($P>0.05$), 见表 2。

表 2 体外细胞增殖能力测定结果 ($\bar{x}\pm s, n=5$)

组别	细胞增殖能力/%
Con 组	100.0±4.6
GSNO 组	102.0±3.3
Ag-GSNO NPs 组	99.0±3.8
<i>F</i>	0.800 0
<i>P</i>	0.492 0

表 3 体外 NO 生成量测定结果 ($\bar{x}\pm s, n=3$)

组别	NO 气体流/[$\times 10^{-10}$ mol/($\text{cm}^2\cdot\text{min}$)]					
	1 h	2 h	4 h	8 h	12 h	24 h
GSNO 组	1.28±0.08	2.23±0.27	2.63±0.26	2.87±0.14	2.33±0.11	1.68±0.17
Ag-GSNO NPs 组	3.82±0.22	7.54±0.20	13.52±0.94	8.34±0.37	4.65±0.16	1.16±0.09
<i>t</i>	18.8	27.4	19.3	24.0	20.7	4.7
<i>P</i>	<0.000 1	<0.000 1	<0.000 1	<0.000 1	<0.000 1	0.009 4

第 1 日, 与 Control 组比较, Model 组、Model+GSNO 组和 Model+Ag-GSNO NPs 组小鼠体重均减轻 ($P<0.05$); 第 2 日, 与 Control 组比较, Model 组、Model+GSNO 组和 Model+Ag-GSNO NPs 组小鼠体重均减轻 ($P<0.05$), 而 Model+GSNO 组和 Model+Ag-GSNO NPs 组小鼠体重均高于 Model 组 ($P<0.05$); 第 3 日, 与 Control 组比较, Model 组、Model+GSNO 组和 Model+Ag-GSNO NPs 组小鼠体重均减轻 ($P<0.05$), Model+Ag-GSNO

2.3 体外 NO 生成量测试结果

Ag-GSNO NPs 组在 1、2、4、8、12 和 24 h 生成的 NO 量高于 GSNO 组, 差异均有统计学意义 ($P<0.05$), 见表 3。

2.4 在体 Ag-GSNO NPs 胶囊保护辐射-诱导肠炎小鼠模型肠道损伤的效果测试结果

第 0 日, Control 组、Model 组、Model+GSNO 组和 Model+Ag-GSNO NPs 组小鼠体重的差异无统计学意义 ($P>0.05$)。

NPs 组小鼠体重高于 Model 组和 Model+GSNO 组 ($P<0.05$); 第 4 日, 与 Control 组比较, Model 组、Model+GSNO 组和 Model+Ag-GSNO NPs 组小鼠体重均减轻 ($P<0.05$), 而 Model+GSNO 组和 Model+Ag-GSNO NPs 组小鼠体重均高于 Model 组 ($P<0.05$), Model+Ag-GSNO NPs 组小鼠体重均高于 Model+GSNO 组 ($P<0.05$), 上述差异均有统计学意义, 见表 4。

与 Control 组比较, Model 组、Model+GSNO 组和 Model+

表 4 小鼠体重监测结果 ($\bar{x}\pm s, n=10$)

组别	小鼠体重/g				
	第 0 日	第 1 日	第 2 日	第 3 日	第 4 日
Control 组	24.3±0.6	24.1±1.4	24.7±1.6	25.2±1.1	24.3±1.2
Model 组	24.5±1.4	19.7±2.2 ^a	16.6±1.3 ^a	15.5±2.2 ^a	13.8±1.7 ^a
Model+GSNO 组	24.3±1.1	21.4±1.7 ^a	18.9±1.8 ^{ab}	16.4±1.3 ^a	15.9±2.1 ^{ab}
Model+Ag-GSNO NPs 组	24.8±0.8	21.2±2.1 ^a	19.2±1.4 ^{ab}	19.8±1.7 ^{abc}	18.3±1.7 ^{abc}
<i>F</i>	0.5	9.5	50.0	72.6	70.9
<i>P</i>	0.660 9	<0.000 1	<0.000 1	<0.000 1	<0.000 1

注: 与 Control 组比较, ^a $P<0.05$; 与 Model 组比较, ^b $P<0.05$; 与 Model+GSNO 组比较, ^c $P<0.05$ 。

Ag-GSNO NPs 组小鼠空肠组织绒毛高度和绒毛宽度、隐窝深度和隐窝数量均降低 ($P<0.05$); 与 Model 组比较, Model+GSNO 组和 Model+Ag-GSNO NPs 组上述指标水平升高 ($P<0.05$); 与 Model+GSNO 组比较, Model+Ag-GSNO NPs 组上述指标水平进一步升高 ($P<0.05$), 上述差异均有统计学意义, 见图 1、表 5。

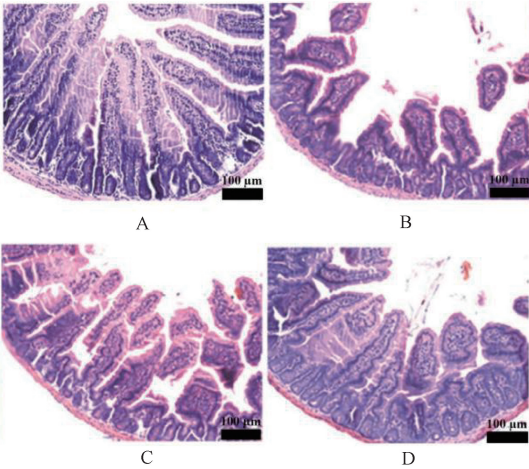
表 5 小鼠空肠 HE 染色组织病理学相关指标测定结果 ($\bar{x}\pm s, n=10$)

组别	绒毛高度/ μm	绒毛宽度/ μm	隐窝深度/ μm	隐窝数量/(个/mm)
Control 组	308.3±0.9	78.9±0.5	96.8±1.3	28.2±1.6
Model 组	184.6±0.6 ^a	33.4±0.7 ^a	56.2±0.8 ^a	16.6±1.2 ^a
Model+GSNO 组	236.1±0.8 ^{ab}	48.3±0.3 ^{ab}	61.7±1.1 ^{ab}	18.3±0.7 ^{ab}
Model+Ag-GSNO NPs 组	267.4±1.0 ^{abc}	61.7±0.4 ^{abc}	77.8±1.5 ^{abc}	20.1±1.4 ^{abc}
<i>F</i>	38 761.0	15 168.0	2 301.0	163.6
<i>P</i>	<0.000 1	<0.000 1	<0.000 1	<0.000 1

注: 与 Control 组比较, ^a $P<0.05$; 与 Model 组比较, ^b $P<0.05$; 与 Model+GSNO 组比较, ^c $P<0.05$ 。

2.5 在体 Ag-GSNO NPs 胶囊降低辐射-诱导肠炎小鼠模型血清炎症因子水平

与 Control 组比较, Model 组、Model+GSNO 组和 Model+Ag-GSNO NPs 组小鼠血清炎症因子 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 和 HMGB1 水平升高 ($P<0.05$); 与 Model 组比较, Model+GSNO 组和 Model+Ag-GSNO NPs 组上述小鼠血清炎症因子水平降低 ($P<0.05$); 与 Model+GSNO 组比较, Model+Ag-GSNO NPs 组上



A. Control 组; B. Model 组; C. Model+GSNO 组; D. Model+Ag-GSNO NPs 组。

图 1 小鼠空肠 HE 染色图

述小鼠血清炎症因子水平降低 ($P<0.05$), 上述差异均有统计学意义, 见表 6。

3 讨论

银盐 (如 AgNO₃ 等银离子) 能够侵入细菌细胞抗菌, 这被认为是银配合物抗菌活性的主要机制。由于细菌细胞和哺乳

表 6 小鼠血清炎症因子水平测定结果表($\bar{x}\pm s$,pg/mL, $n=10$)				
组别	TNF- α	IL-1 β	IL-6	HMGB1
Control 组	5.3 $\pm$ 0.6	41.5 $\pm$ 1.8	8.2 $\pm$ 0.8	28.4 $\pm$ 0.6
Model 组	102.6 $\pm$ 2.8 ^a	77.4 $\pm$ 2.1 ^a	24.4 $\pm$ 1.1 ^a	41.1 $\pm$ 1.1 ^a
Model+GSNO 组	58.5 $\pm$ 1.6 ^{ab}	60.7 $\pm$ 1.4 ^{ab}	16.1 $\pm$ 1.3 ^{ab}	37.6 $\pm$ 0.7 ^{ab}
Model+Ag-GSNO NPs 组	33.4 $\pm$ 1.2 ^{abc}	47.4 $\pm$ 1.6 ^{abc}	12.8 $\pm$ 0.9 ^{abc}	30.2 $\pm$ 0.9 ^{abc}
F	5 588.0	834.9	429.4	505.2
P	<0.000 1	<0.000 1	<0.000 1	<0.000 1

注:与 Control 组比较,^a $P<0.05$;与 Model 组比较,^b $P<0.05$;与 Model+GSNO 组比较,^c $P<0.05$ 。

动物细胞的区别,两种细胞类型金属转运系统的不同,银配合物抗菌具有靶向性。革兰阳性菌和革兰阴性菌的细菌细胞表面和真菌孢子带负电荷,Ag NPs 带正电荷,静电吸引力将使细菌与 Ag NPs 相互作用,从而改变细菌细胞膜的结构和通透性,Ag NPs 进入细胞内引起氧化应激损伤级联^[10]。此外,Ag NPs 已被证明与细菌细胞膜的含硫成分相互作用,形成对应 Ag-S 离子,阻碍细胞细胞壁的正常排列^[11]。但是,由于 Ag NPs 的相对低稳定性,对哺乳动物细胞存在一定毒性。Ag NPs 长期暴露将引起哺乳动物主要器官毒性,如肝毒性、肾毒性和肺毒性^[12-13]。因此,需要联合其他抗菌活性物质,协同生效。

GSNO 的抗菌活性是由于其能够生成 NO,并且是一种高效、稳定、可实现缓释的 NO 内源性供体;GSNO 在动物细胞中含量丰富;GSNO 可分解为氧化型谷胱甘肽和谷胱甘肽,有良好的生物相容性;GSNO 相对容易合成和纯化^[7]。GSNO 的抗菌活性受多种因素影响,包括病原体的菌株类型、GSNO 剂量和浓度、剂型、药物处理时间以及 NO 释放动力学等。例如,低剂量 GSNO 不足以抑制铜绿假单胞菌感染肺部引起的囊性纤维化的进展^[14]。与使用单纯 GSNO 粉末相比,使用喷雾干燥技术制备的可吸入 GSNO 粉末具有气溶胶特性,能够更好地破坏多重耐药药曼不动杆菌和铜绿假单胞菌在肺支气管形成的生物膜^[15]。本研究中,Ag GSNO NPs 的抗菌活性综合了 Ag NPs 的重金属抗菌特性与 GSNO 的高效、长效释放 NO 的抗菌活性,协同作用在放射性肠炎小鼠模型中发挥抗菌抗炎活性。Ag-GSNO NPs 组在 1、2、4、8、12 和 24 h 生成的 NO 量均高于 GSNO 组。而体外细胞毒性实验结果显示,与 Con 组比较,GSNO 组和 Ag-GSNO NPs 组的细胞毒性差异无统计学意义($P>0.05$)。在体辐射-诱导肠炎小鼠模型的研究中,造模后第 4 日,与 Model 组和 Model+GSNO 组比较,Model+Ag-GSNO NPs 组小鼠空肠组织绒毛高度和绒毛宽度、隐窝深度和隐窝数量等指标水平显著升高,模型小鼠的肠道组织病理学状态改善。与 Model 组比较,Model+Ag-GSNO NPs 组模型小鼠全身炎症因子 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 和 HMGB1 的水平降低。特别是 HMGB1,其是一种内源性损伤相关分子模式。在辐射-诱导肠炎小鼠模型中,全身性 HMGB1 的水平会大幅升高。HMGB1 通过 Caspase-3/HMGB1/Toll 样受体 4 信号轴介导溃疡性结肠炎大鼠的肠道炎症和损伤^[16]。完整的肠道充当屏障功能,防止微生物及其代谢物的损害。肠道屏障由肠上皮细胞、固有层、黏液层和肠道微生物群组成^[17]。上皮细胞和固有层提供物理屏障,防止肠腔内容物向内渗漏,并与免疫细胞和基质细胞协同限制其与肠上皮的直接接触。单层上皮细胞和单层上皮细胞间的紧密连接蛋白共同控制细胞间通透性^[17]。与 Control 组比较,Model 组辐照后肠道黏液层基本被破坏,液体屏障丧失;肠绒

毛细胞形态萎缩,数量减少;杯状细胞间的间隙大大增加,肠隐窝数量和深度大大降低,隐窝结构被破坏;肠腔内有毒物质、消化酶和细菌很容易到达肠固有层和肠上皮。与 Model 组比较,Model+GSNO 组肠壁组织病理学特征有所改善,肠上皮肠绒毛细胞指状形态和数量有所恢复,但肠隐窝细胞间紧密连接仍然为受损状态;而 Model+Ag-GSNO NPs 组肠隐窝结构和形态基本正常,指状绒毛形态和数量大大恢复;隐窝内细胞和肠绒毛细胞还存在不规则排列,但相较于 Model 组和 Model+GSNO 组已大为改善。由此可见,Model+Ag-GSNO NPs 组方案的抗菌、抗炎活性显著。

尽管本研究尚未深入探讨 Ag-GSNO NPs 抑菌及在体抑制辐射-诱导肠炎小鼠模型肠道组织病理学损伤、降低全身性炎症水平的主要分子和免疫学机制,但基于本研究结果可知,Ag-GSNO NPs 胶囊治疗辐射-诱导肠炎小鼠模型肠道感染的活性优于单纯的 GSNO 粉剂胶囊,并能降低模型小鼠血清 HMGB1 等全身性炎症因子水平。

参考文献

- [1] LOGE L, FLORESCU C, ALVES A, et al. Radiation enteritis: diagnostic and therapeutic issues[J]. J Visc Surg, 2020, 157(6): 475-485.
- [2] 黄定凤, 刘玥, 郑利媛, 等. 前列腺癌患者放射性肠炎预防护理流程改进的行动研究[J]. 护理学杂志, 2024, 39(9): 30-35.
- [3] YANG Q L, QIN B Z, HOU W L, et al. Pathogenesis and therapy of radiation enteritis with gut microbiota[J]. Front Pharmacol, 2023, 14: 1116558.
- [4] ANDRABI S M, SHARMA N S, KARAN A, et al. Nitric oxide: physiological functions, delivery, and biomedical applications[J]. Adv Sci (Weinh), 2023, 10(30): e2303259.
- [5] DOUGLASS M, HOPKINS S, PANDEY R, et al. S-nitrosoglutathione-based nitric oxide-releasing nanofibers exhibit dual antimicrobial and antithrombotic activity for biomedical applications[J]. Macromol Biosci, 2021, 21(1): e2000248.
- [6] LI W W, WANG D Y, LAO K U, et al. Inclusion complexation of S-nitrosoglutathione for sustained nitric oxide release from catheter surfaces: a strategy to prevent and treat device-associated infections [J]. ACS Biomater Sci Eng, 2023, 9(3): 1694-1705.
- [7] ROLIM W R, PIERETTI J C, RENÓ D L S, et al. Antimicrobial activity and cytotoxicity to tumor cells of nitric oxide donor and silver nanoparticles containing PVA/PEG films for topical applications [J]. ACS Appl Mater Interfaces, 2019, 11(6): 6589-6604.
- [8] DOUGLASS M E, GOUDIE M J, PANT J, et al. Catalyzed nitric oxide release via Cu nanoparticles leads to an increase in antimicrobial effects and hemocompatibility for short term extracorporeal circulation[J]. ACS Appl Bio Mater, 2019, 2(6): 2539-2548.
- [9] LIU C M, WEN L B, XIAO Q, et al. Nitric oxide-generating compound GSNO suppresses porcine circovirus type 2 infection *in vitro* and *in vivo*[J]. BMC Vet Res, 2017, 13(1): 59.
- [10] JENA P, BHATTACHARYA M, BHATTACHARJEE G, et al. Bimetallic gold-silver nanoparticles mediate bacterial killing by disrupting the actin cytoskeleton MreB[J]. Nanoscale, 2020, 12(6): 3731-3749.
- [11] DU T, XIAO Z H, CAO J L, et al. NIR-activated multi-hit

therapeutic Ag₂S quantum dot-based hydrogel for healing of bacteria-infected wounds[J]. *Acta Biomater*, 2022, 145: 88-105.

[12] KARIMI H, LATIFI N A, MEHRJERDI A Z, et al. Histopathological changes of organs (lungs, liver, kidney, and brain) after using two types of AgiCoat and acticoat nanosilver dressings on deep second-degree burn in rat[J]. *J Burn Care Res*, 2020, 41(1): 141-150.

[13] FERDOUS Z, AL-SALAM S, YUVARAJU P, et al. Remote effects and biodistribution of pulmonary instilled silver nanoparticles in mice[J]. *NanoImpact*, 2021, 22: 100310.

[14] QIAN H, YE Z M, PI L P, et al. Roles and current applications of

S-nitrosoglutathione in anti-infective biomaterials[J]. *Mater Today Bio*, 2022, 16: 100419.

[15] DAS T, CHOONG H J, KWANG Y C, et al. Spray-dried particles of nitric oxide-modified glutathione for the treatment of chronic lung infection[J]. *Mol Pharm*, 2019, 16(4): 1723-1731.

[16] MIAO Z W, GU M J, RAZA F, et al. Isoliquiritin ameliorates ulcerative colitis in rats through caspase 3/HMGB1/TLR4 dependent signaling pathway[J]. *Curr Gene Ther*, 2024, 24(1): 73-92.

[17] MINTON K. Intestinal barrier protection[J]. *Nat Rev Immunol*, 2022, 22(3): 144-145.

(收稿日期:2024-10-23 修回日期:2025-01-20)

(上接第 538 页)

工艺,如干混悬剂和喷雾技术等。这些技术工艺较复杂,产业化设备相对缺乏,可以产学研一体合作,提升技术水平。(4)药品的剂型与规格,儿童用药需要有适合儿童使用的剂型和规格,以确保剂量的准确性和用药的便利性。(5)儿童药品的监管政策,监管政策的完善程度,如儿童药品的审评审批机制、数据保护政策等,也会对儿童用药研发产生重要影响^[17]。

未来,儿童用药的研发和方向可以重点倾向以下 3 个方面:(1)更加注重剂型创新,开发更多适合儿童的剂型,以及方便调整剂量的新技术、新方法,满足不同年龄段儿童的用药需求^[18]。(2)加强安全性研究,开发新药品。制定覆盖不同年龄段的儿童临床试验,获取安全性和疗效的实验数据以开发新药品。(3)提高依从性,研发口感好、易于接受的药物,减少儿童服药的抗拒心理。利用新的研发技术,如新型凝胶给药技术、冻干工艺口腔速释给药技术、低龄儿童个性化给药(临时调配)技术等,为儿童药物研发提供更多的数据支持。目前,儿童用药的研发和上市正在受到广泛关注和政策支持,这将明显改善儿童用药短缺的现状^[19]。

综上所述,本研究经过梳理鼓励清单中药品国产上市情况、适应证及剂型情况,分析药物使用受限的因素,总结了鼓励清单对儿童用药市场带来的积极影响:一方面,加快了儿童用药的上市进程,缓解了儿科临床用药需求;另一方面,鼓励清单中的药品有些已被纳入国家基本医疗保险药品目录,减轻了家庭的经济负担。儿童用药是一个系统工程,需要政府、医疗机构、药品生产企业等各方的共同努力和协作,以确保儿童用药的科学、合理使用。

参考文献

[1] 张花香,王晓玲,华雪蔚,等. 中国儿童用药的政策文本研究[J]. *中国医药工业杂志*, 2023, 54(2): 283-288.

[2] 肖月,孙潭霖,赵琨,等. 我国儿童药品供应保障体系核心问题及对策[J]. *卫生经济研究*, 2021, 38(6): 6-9.

[3] 国家卫生健康委办公厅. 国家卫生健康委办公厅关于进一步加强儿童临床用药管理工作的通知: 国卫办医政函〔2023〕11 号[EB/OL]. (2023-01-16)[2024-09-15]. https://www.gov.cn/zhengce/zhengceku/2023-01/20/content_5738134.htm.

[4] 中华人民共和国国家卫生健康委员会药物政策与基本药物制度司. 关于印发首批鼓励研发申报儿童药品清单的通知: 国卫办药政函〔2016〕573 号[EB/OL]. (2016-06-01)[2024-10-12].

<http://www.nhc.gov.cn/yaozs/s3581/201605/b0ea217312314c5098d905094f7e67ee.shtml>.

[5] 陈敏,张伶俐,曾力楠,等. 全球儿童合理用药国家药物政策现状分析[J]. *中国药房*, 2017, 28(24): 3313-3316.

[6] 国家药品监督管理局. 2023 年度药品审评报告[EB/OL]. (2024-02-04)[2024-02-04]. <https://www.nmpa.gov.cn/xxgk/fgwj/gzwj/gzwjyp/20240204154334141.html>.

[7] 王欣,薛佳怡,李小芬. 鼓励政策支持下我国儿童用药上市批准情况分析[J]. *中国新药与临床杂志*, 2023, 42(6): 337-342.

[8] 郝婵娟,倪鑫. 儿童罕见病诊治现状及展望[J]. *罕见病研究*, 2022, 1(3): 229-232.

[9] 张学. 加快探索罕见病用药保障的“中国模式”[J]. *中国卫生*, 2023(3): 25.

[10] 钟大放,魏敏吉,张逸凡. 基于生物药剂学分类系统的生物等效性豁免指导原则草案[J]. *中国药品标准*, 2023, 24(5): 547-550.

[11] 李新宇,邵蓉,白铭钰,等. 我国儿童药保障政策文本量化分析——基于政策工具、政策目标的二维框架[J]. *中国卫生政策研究*, 2022, 15(8): 68-73.

[12] 国家药品监督管理局. 国家药品监督管理局关于氟哌啶醇片等品种说明书增加儿童用药信息的公告(2021 年第 75 号)[EB/OL]. (2021-05-31)[2024-09-08]. <https://www.nmpa.gov.cn/xxgk/ggtg/ypggtg/ypshmsxdgg/20210531151006143.html>.

[13] 唐凌,吕俊,夏琳,等. 儿童抗肿瘤药物研发思考[J]. *中国医药工业杂志*, 2022, 53(11): 1664-1670.

[14] 国家药品监督管理局. 国家药监局关于发布《已上市药品说明书增加儿童用药信息工作程序(试行)》的公告(2023 年第 68 号)[EB/OL]. (2023-05-31)[2024-09-10]. <https://www.nmpa.gov.cn/directory/web/nmpa/xxgk/ggtg/ypggtg/ypqtggtg/20230531142548157.html>.

[15] 张云霞,张萌,成晓玲,等. 我国儿科人群超说明书用药的临床应用及应对策略[J]. *儿科学杂志*, 2024, 30(8): 48-52.

[16] 李燕,秦倩倩,王妍,等. 57 家医疗机构儿科临床药师发展情况调研[J]. *中国合理用药探索*, 2024, 21(7): 110-115.

[17] 何思颐,刘佳宁,李海龙,等. 中国儿童药品短缺原因分类体系的系统评价[J]. *中国循证医学杂志*, 2024, 24(9): 1030-1037.

[18] 李文君,卢梦情,徐蔼琳,等. 国内外不同年龄段儿童用药剂型的比较与思考[J]. *中国医院药学杂志*, 2019, 39(21): 2236-2239.

[19] 杨志敏,张培培. 国外儿童药物审评审批管理现状及特点分析[J]. *中国药学杂志*, 2012, 47(10): 745-748.

(收稿日期:2024-11-13 修回日期:2025-01-22)