DOI:10.16016/j.1000-5404.202001170

炎症微环境响应性仿高密度脂蛋白纳米药物的构建及其体外抗动脉粥样硬化作用评价

刘仁凤,赵 阳,窦 寅,张建祥 400038 重庆,陆军军医大学(第三军医大学)药学与检验医学系药剂学教研室

[摘要] **目的** 基于活性响应性材料,采用仿生策略构建具有炎症响应性功能、抗动脉粥样硬化作用的仿高密度脂蛋白(high-density lipoprotein, HDL)纳米药物。**方法** 通过化学键合的方式将对羟甲基苯硼酸频那醇酯(phenylboronic acid pinacol ester, PBAP)与β-环糊精(β-cyclodextrin, β-CD)反应,合成具有氧化敏感性的材料 OXbCD。采用自组装纳米沉淀法和共挤出法制备仿 HDL 纳米粒(HDL-mimetic nanoparticles, mHDL NP)并通过红外光谱、核磁、电镜等方法对材料及纳米粒进行表征。选用 RAW264.7 细胞系进行细胞实验,利用流式细胞仪和激光共聚焦考察细胞对纳米粒吞噬作用,并通过 ELISA 测定细胞培养上清炎症因子 TNF-α 和 MCP-1,评价纳米粒对细胞产生炎症因子的影响;选用 DCFH-DA 活性氧探针检测纳米粒对细胞活性氧产生水平的改变;并通过多种方法评价纳米粒对细胞胆固醇外排和泡沫细胞形成的影响。**结果** 光谱学分析表明约 5 个 PBAP 键合于每个 β-CD 分子;电镜和粒径分布结果表明所制备的纳米粒为规则类球形,粒径分布均匀,平均粒径约 200 nm。细胞实验证明 RAW264.7 细胞对纳米粒的吞噬具有时间和剂量依赖性,且能显著抑制炎症因素刺激下细胞炎症因子的分泌和活性氧的产生($P<0.05$),具有明显的抗炎和抗氧化作用;mHDL NP 能明显促进细胞胆固醇外排($P<0.05$),且细胞外排率与细胞和 mHDL NP 孵育的时间以及 mHDL NP 的浓度具有相关性;mHDL NP 亦能显著抑制巨噬细胞泡沫化的进程。**结论** 基于活性氧响应性材料 OXbCD 成功合成 mHDL NP,该 NP 同时具有抗氧化和胆固醇逆转运的作用,并在细胞水平证明该纳米粒具有抗动脉粥样硬化的能力。

[关键词] 炎症微环境响应性;纳米药物;动脉粥样硬化;高密度脂蛋白;胆固醇逆转运
[中图法分类号] R543.5; R944.9; R966 [文献标志码] A

Construction of an inflammatory microenvironment-responsive HDL-mimetic nanoparticle and evaluation of its *in vitro* anti-atherosclerotic activity

LIU Renfeng, ZHAO Yang, DOU Yin, ZHANG Jianxiang Department of Pharmaceutics, Faculty of Pharmacy and Laboratary Medicine, Army Medical University (Third Military Medical University), Chongqing, 400038, China

[**Abstract**] **Objective** To construct an inflammation-responsive high-density lipoprotein (HDL)-mimetic nanoparticle with anti-atherosclerotic activity using a bioinspired strategy based on a oxidation-responsive material. **Methods** 4-(hydroxymethyl) phenylboronic acid pinacol ester (PBAP) was chemically conjugated to β-cyclodextrin (β-CD) to synthesize a reactive oxygen species (ROS)-sensitive material. Nanoprecipitation and coextrusion methods were used to prepare HDL-mimetic nanoparticles (mHDL NP). Spectroscopy was employed to verify the structure of the synthesized material, and microscopy was utilized to observe the morphology of the nanoparticles. We observed phagocytosis of the nanoparticles by murine RAW264.7 macrophages using flow cytometry and confocal microscopy, and examined the release of the inflammatory factors tumor necrosis factor-α (TNF-α) and monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) in the supernatant by the macrophages cultured in the presence of the nanoparticles using ELISA. We also used a fluorescent ROS probe DCFH-DA to detect the changes of ROS generated in RAW264.7 macrophages in response to the nanoparticles. Different methods were used to assess the effects of the nanoparticles on cholesterol efflux and foam cell formation in RAW264.7 cells. **Results** Spectroscopy analysis showed that

[基金项目] 国家自然科学基金青年科学基金(81701832)
[通信作者] 张建祥,E-mail:jxzhang@tmmu.edu.cn

about 5 PBAP units were conjugated to each β-CD molecule. The prepared nanoparticles had a well-defined spherical shape with a narrow size distribution and a mean diameter of about 200 nm. *In vitro* experiments showed that RAW264.7 cells phagocytosed the nanoparticles in a time- and dose-dependent manner. mHDL NP significantly inhibited the secretion of the inflammatory factors and ROS production by RAW264.7 cells in response to inflammatory stimulation ($P<0.05$), which demonstrated potent anti-inflammatory and antioxidant activities of the nanoparticles. mHDL NP time- and concentration-dependently promoted cholesterol efflux ($P<0.05$) and significantly inhibited foam cell formation in RAW264.7 macrophages. **Conclusion** We successfully synthesize HDL-mimetic nanoparticles with antioxidant and reverse cholesterol transport capacities. Our preliminary *in vitro* cellular evaluations demonstrate obvious anti-atherosclerotic activity of the synthesized nanoparticles.

[**Key words**] inflammatory microenvironment responsiveness; nano-drug; atherosclerosis; high-density lipoprotein; reverse cholesterol transport

Supported by the National Natural Science Foundation for Young Scholars of China(81701832). Corresponding author: ZHANG Jianxiang, E-mail:jxzhang@tmmu.edu.cn

心血管疾病已经超越肿瘤成为人类健康的第一杀手[1]。作为心肌梗死、脑卒中等多种疾病共同的病理基础,动脉粥样硬化(atherosclerosis,AS)成为人类急需攻克的医学难题。目前以他汀类为代表的降脂药广泛应用于AS的防治[2],但是并未能有效抑制其致死率和致残率,给人类生活带来了巨大的经济负担。研究表明,炎症参与AS发生、发展的全过程,如内皮功能的紊乱、泡沫细胞的形成、平滑肌细胞的增殖、易损斑块的形成等[2-4],使得抗炎治疗成为最具前景的治疗方式。大量的抗炎药物被应用于抗AS研究,尽管取得了一定的疗效,但是由于传统的药物递送方式效率低,无靶向特点,长期使用抗炎药物带来了很多不必要的副作用,从而影响其进一步的临床应用。近年来,纳米技术的出现为药物递送提供了更好的选择。如基于炎症局部的病理特征构建的微环境响应性纳米粒,能够实现药物的靶向响应性释放[5-8],相较于传统制剂具有更好的药代动力学参数和组织特异性,同时对于疏水性药物递送具有更高的载药量和包封率[9]。此外,随着仿生策略的兴起,基于响应性材料构建的仿生纳米粒具有更为显著的体内生物相容性和躲避网状内皮系统吞噬的能力,能够进一步增强递送效率,提高治疗效果[10-12]。高密度脂蛋白(high-density lipoprotein, HDL)具有天然的抗AS作用[13],其保护作用主要体现在介导细胞内胆固醇逆转运至肝脏代谢的能力,从而降低胞内过多的脂质滞留聚集[14-16]。因此,本研究旨在利用具有炎症局部活性氧响应性的材料,采用仿生策略构建仿HDL纳米粒(HDL-mimetic nanoparticles, mHDL NP),以期获得一种既能够实现局部活性氧(reactive oxygen species,ROS)响应性清除,又能够介导胆固醇逆转运的多功能纳米系统,为AS的防治提供新的选择。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

β-环糊精(β-CD)、大豆卵磷脂均购自日本Tokyo Chemical Industry公司;对羟甲基苯硼频那醇酯(PBAP)、N,N′-羰基二咪唑(CDI)、4-二甲氨基吡啶(DMAP)、脂多糖(LPS)、油红O均购自Sigma-Aldrich公司;二硬脂酰磷脂酰乙酰胺-甲氧基聚乙二醇2000(DSPE-PEG2000)购自瑞士Corden Pharma公司;DMEM培养基、胎牛血清、青霉素-链霉素双抗、胰酶均购自HyClone公司;干扰素γ(IFN-γ)购自Sigmia公司;肿瘤坏死因子α(TNF-α)、单核细胞趋化蛋白-1(MCP-1)ELISA试剂盒购自博士德生物公司;活性氧探针DCFH-DA购自Beyotime公司;氧化低密度脂蛋白(OX-LDL)购自广州奕元生物技术有限公司;NBD-胆固醇购自美国Avanti Polar Lipid公司。

1.2 方法

1.2.1 氧化敏感性材料的合成与表征 将PBAP溶于适量二氯甲烷(DCM),经CDI活化后与β-CD反应,乙醚沉淀,离心得到目标产物(OXbCD)。称取适量产物分别进行核磁和红外光谱检测。

1.2.2 不同纳米粒的制备与表征 取4 mg卵磷脂和6 mg DSPE-PEG2000于9.6 mL双蒸水中,65 ℃下搅拌30 min,作为水相;室温条件下将50 mg OXbCD的甲醇溶液缓慢滴加在水相中,室温搅拌反应2 h,得到氧化响应性纳米粒(OXbCD NP)。将1 mg Cy5荧光染料溶解在OXbCD甲醇溶液中,与上述相同处理可得到Cy5荧光纳米粒(Cy5-OXbCD NP)。取定量卵磷脂、DSPE-PEG2000的乙醇溶液于茄形瓶中,45 ℃旋蒸成干膜,含有定量载脂蛋白(Apo-A1)的PBS水

化,得到磷脂混悬液。将磷脂混悬液挤压过不同孔径的聚碳脂膜(Whatman),再将该悬液与 OXbCD NP 均匀混合,挤压过 400 nm 聚碳脂膜,得到仿高密度脂蛋白纳米粒(mHDL NP);若混悬液与 Cy5-OXbCD NP 混合挤压过膜,得到仿高密度脂蛋白荧光纳米粒(Cy5-mHDL NP)。通过激光粒度仪(DLS)测定纳米粒粒径大小、分布、表面电位。采用透射电子显微镜(TEM)、场发射扫描电子显微镜(FE-SEM)观察纳米粒子形貌。

1.2.3 纳米粒体外水解研究 配置系列 H_2O_2 浓度的 PBS 溶液,取 0.4 mL 现制备 OXbCD NP 溶液于 1.6 mL 对应的介质中,利用紫外分光光度计测对应点透光率;并选定 1 mmol/L H_2O_2 浓度的 PBS 溶液为水解介质,分别在设定时间点拍照,定性观察纳米粒对双氧水的响应性。

1.2.4 纳米粒体外生物学评价

1.2.4.1 纳米粒细胞吞噬行为研究 流式细胞术检测 RAW264.7 细胞(中国科学院细胞库)对 OXbCD NP 的吞噬:1 mL(2×10^5 个/mL)RAW264.7 细胞悬液接种在 12 孔板中,孵育过夜;弃去培养基,加入含有不同浓度 Cy5-OXbCD NP 的 DMEM 培养基,孵育 2 h,考察细胞对纳米粒吞噬的浓度依赖性;或另加入含有 50 μg/mL Cy5-OXbCD NP 的培养基,分别孵育不同时间考察细胞对纳米粒吞噬的时间依赖性;胰酶消化细胞收集细胞悬液,1 000 r/min 离心 5 min 后弃上清,重悬细胞,使其浓度为($1\sim5$)$\times10^6$ 个/mL,取 100 μL 细胞悬液上机检测。激光共聚焦观察 RAW264.7 细胞对 OXbCD NP 的吞噬:1 mL(2×10^5 个/mL)细胞悬液接种在 20 mm 细胞爬片上,孵育过夜;分别加入含不同浓度 Cy5-OXbCD NP 的 DMEM 培养基,孵育 2 h,观察细胞对纳米粒吞噬的浓度依赖性;或另加入含有 50 μg/mL Cy5-OXbCD NP 的培养基,分别孵育不同时间观察细胞对纳米粒吞噬的时间依赖性;培养基洗涤,多聚甲醛固定,用 75 nmol/L Lyso-tracker green DND-26 对溶酶体染色 1 h,DAPI 复染,封片后激光共聚焦观察拍照,Zen 软件处理图像。

流式细胞术考察细胞对不同纳米粒的吞噬:1 mL(2×10^5 个/mL)细胞悬液接种在 12 孔板中,孵育过夜;分别加入含有等量 Cy5-OXbCD NP 和 Cy5-mHDL NP 的 DMEM 培养基,孵育 2 h,收集细胞上机检测。

1.2.4.2 细胞外炎症因子水平测定 在 24 孔板中加入 0.5 mL RAW264.7 细胞(2×10^5 个/mL)接种,DMEM 培养基过夜,弃去培养基,加入 0.5 mL 含有 50 μg/mL OXbCD NP 或 mHDL NP 的 DMEM 培养基,孵育 2 h,弃去培养基并加入 0.5 mL 100 ng/mL 脂多糖(LPS)和 100 IU 干扰素 γ(IFN-γ)培养基孵育细胞 24 h;收集上清液,用 ELISA 方法检测上清液中 TNF-α、MCP-1 的含量。

1.2.4.3 细胞内活性氧水平测定 1 mL(2×10^5 个/mL)RAW264.7 细胞悬液接种在 12 孔板中,培养过夜;加入含有 50 μg/mL OXbCD NP 或 mHDL NP 或空白(Model)的 DMEM 培养基,共孵育 2 h;再加入含有 100 ng/mL PMA 的培养基共孵育 4 h;接着加入含有 10 μmol/L DCFH-DA 活性氧探针的空白培养基,37 ℃ 孵育 20 min,收集细胞,流式细胞仪检测(EX/EM:488 nm/525 nm)。

1.2.4.4 胆固醇外排水平测定 酶标仪考察纳米粒对细胞胆固醇外排的影响:1 mL(2×10^5 个/mL)RAW264.7 细胞悬液接种在 12 孔板中,饥饿细胞 2 h,与含有 1 μg/mL NBD-胆固醇的无血清培养基共孵育 4 h;吸弃上清,加入含有 80 μg/mL OXbCD NP 或 mHDL NP 的培养基共孵育不同时间考察纳米粒对细胞胆固醇外排的时间依赖性,或加入含有不同浓度 OXbCD NP 或 mHDL NP 的培养基,共孵育 4 h,考察纳米粒对细胞胆固醇外排的剂量依赖性;在设计时间点收集细胞培养上清和细胞,并加入 0.1% Triton-X100 裂解细胞,14 000×*g* 离心 15 min,取上清;酶标仪检测细胞培养上清和细胞裂解液中的荧光强度(EX/EM:465 nm/535 nm)。胆固醇外排率 = Fm×100%/(Fm+Fc),其中 Fm 指培养基中的荧光值,Fc 指细胞裂解液中的荧光值。

激光共聚焦观察纳米粒对细胞胆固醇外排的影响:1×10^5 个/mL 细胞接种在 15 mm 细胞爬片上,孵育过夜使细胞贴壁饥饿细胞 2 h,与含有 1 μg/mL NBD-胆固醇的无血清培养基共孵育 4 h;吸弃上清,加入含有 80 μg/mL OXbCD NP 或 mHDL NP 的培养基共孵育 4 h;多聚甲醇固定细胞 15 min,DAPI 染液复染细胞核,封片后激光共聚焦观察,Zen 软件处理图片。

1.2.4.5 纳米粒对泡沫细胞形成的影响 1 mL(1×10^5 个/mL)RAW264.7 细胞悬液接种在 12 孔板中,与含有 100 ng/mL LPS 和 100 IU IFN-γ 的培养基孵育细胞 24 h,后加入含有 50 μg/mL OXbCDNP 或 mHDL NP 培养基,孵育 2 h;再与含有 50 μg/mL OX-LDL 的培养基共孵育 36 h,油红工作液染色,光镜拍照。

1.2.4.6 纳米粒体外安全性评价 细胞毒性检测:细胞按 1×10^4 个/mL 接种在 96 孔板,培养过夜;加入不同浓度 OXbCD NP 的培养基,孵育 12 h 或 24 h,在设计时间点加入 CCK-8 溶液,继续培养 2 h,在 450 nm 处测光密度值[$D(450)$]。

体外溶血实验检测:雄性 SD 大鼠麻醉取血于 EDTA 抗凝管中,经处理得到红细胞悬液;取一定体积的红细

胞悬液、生理盐水、不同浓度的纳米粒混合,考察纳米粒体外溶血情况;接着 37 ℃孵育 2 h,300×g 离心 5 min,于酶标仪 570 nm 处测定光密度值[D(570)],溶血分数=[D(570)$_{实验组}$−D(570)$_{阴性组}$]/[D(570)$_{阳性组}$−D(570)$_{阴性组}$]×100%。

1.3　统计学分析

数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示,运用 SPSS20.0 统计软件,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,两组间比较采用非配对 t 检验。检验水准 $\alpha=0.05$。

2　结果

2.1　氧化敏感性材料的红外和核磁表征

核磁图谱(图 1A)表明 PBAP 成功键合在 β-CD 上,1 个 β-CD 分子约键合 5 个 PBAP 分子。红外图谱(图 1B)中 OXbCD 在 3 300 cm^{-1} 信号减弱,在 1 745 cm^{-1} 和 1 500 cm^{-1} 分别出现羰基信号、苯环信号,同样证明 PBAP 成功连接在 β-CD 上,活性氧响应性材料成功合成。

2.2　仿高密度脂蛋白纳米粒的表征和对体外水解行为研究

如图 2A~F 所示,OXbCD NP 与 mHDL NP 分布均匀,形态为规则类球形。OXbCD NP 粒径为(190±2)nm,PDI 为 0.183;mHDL NP 粒径为(210±10)nm,PDI 为 0.143。TEM 结果可以看出 mHDL NP 为明显的核壳结构,其内核为类球形的实心结构,外层包裹着一层脂质膜。OXbCD NP 具有 H_2O_2 响应性水解性能,当 H_2O_2 浓度为 1 mmol/L 时,在 10 min 左右就能看到明显的水解,30 min 时几乎完全水解(图 2G);OXbCD NP 与系列浓度梯度双氧水中共孵育时,OXbCD NP 的水解速度与双氧水的浓度呈正相关性(40 min 时皮尔森相关系数为 0.86),在高浓度双氧水的水解速度显著大于低浓度的双氧水,40 min 时,OXbCD NP 在 1 mmol/L 和 0.25 mmol/L H_2O_2 的水解百分数为 79.7% 和 23.7%(图 2H),直接证明所制备纳米粒具有活性氧响应性水解的能力。

2.3　RAW264.7 细胞对纳米粒的吞噬作用

运用流式细胞术考察 RAW264.7 细胞对 OXbCD NP 的吞噬能力,如图 3A、B 所示,随着 OXbCD NP 与细胞共孵育时间的延长,纳米粒在细胞内的聚集增多,呈正相关性(皮尔森相关系数为 0.98),但 5 h 后细胞吞噬会逐渐达到饱和,与 0 h 组比较,差异有统计学意义(P<0.01);而高浓度纳米粒与细胞共孵育会增加细胞对纳米粒的吞噬,与 0 μg/mL 组比较,20、50、100 μg/mL 组平均荧光强度显著增加(P<0.05,P<0.01,图 3C、D);表明细胞对纳米粒的吞噬具有时间和浓度依赖性。共聚焦结果显示,随着浓度或者时间的增加,Cy5(红色)在胞内聚集增加,且与溶酶体(绿色)有很好的共定位(图 4、5),表明细胞吞噬纳米粒是通过溶酶体途径。通过比较细胞对 OXbCD NP 和 mHDL NP 吞噬能力的不同,发现细胞对 mHDL NP 的吞噬能力显著下降(P=0.01,图 3E、F),表明从细胞水平验证 mHDL NP 的成功构建。

2.4　纳米粒体外抗 AS 作用评价

结果(图 6A、B)显示,与 Model 组比较,两种纳米粒都能显著降低细胞炎症因子 TNF-α(OXbCD NP:P=0.008;mHDL NP:P<0.001)和 MCP-1(OXbCD NP:P=0.025;mHDL NP:P<0.001)的表达,且 mHDL NP 降低效果比 OXbCD NP 更为显著(P<0.05),比 OXbCD NP 组降低 15.6%,推测纳米粒具有抑制巨噬细胞炎症因子分泌的作用。而天然的高密度脂蛋白具有抗炎的效果,进一步在细胞水平证明 mHDL NP 的成功构建。

运用活性氧探针检测细胞内 ROS 水平(图 6C、D),纳米粒能明显降低细胞 ROS 的产生量,与 Model 组比较,mHDL NP 组 ROS 产生相对量降低 15.6%(P=0.027),具有抗氧化的能力;证明表面修饰的仿 HDL 磷脂膜不会影响材料对氧化应激的响应性。

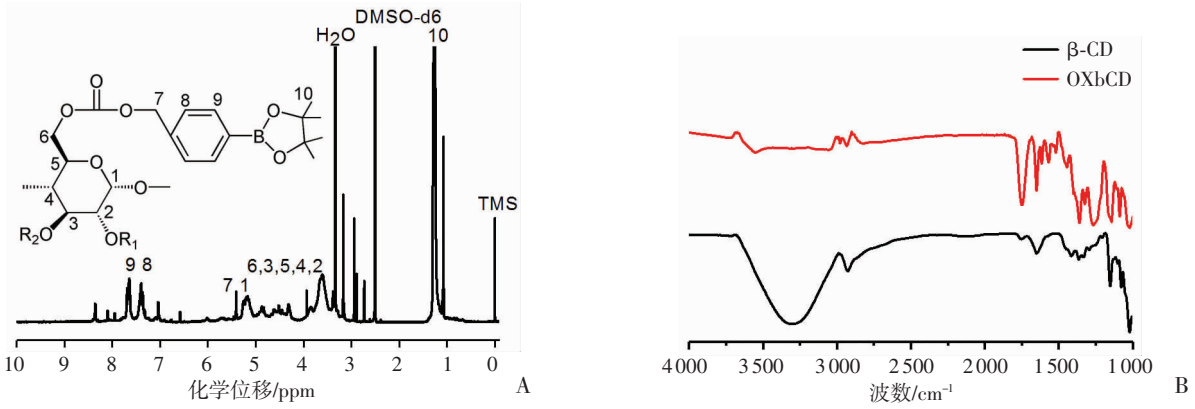
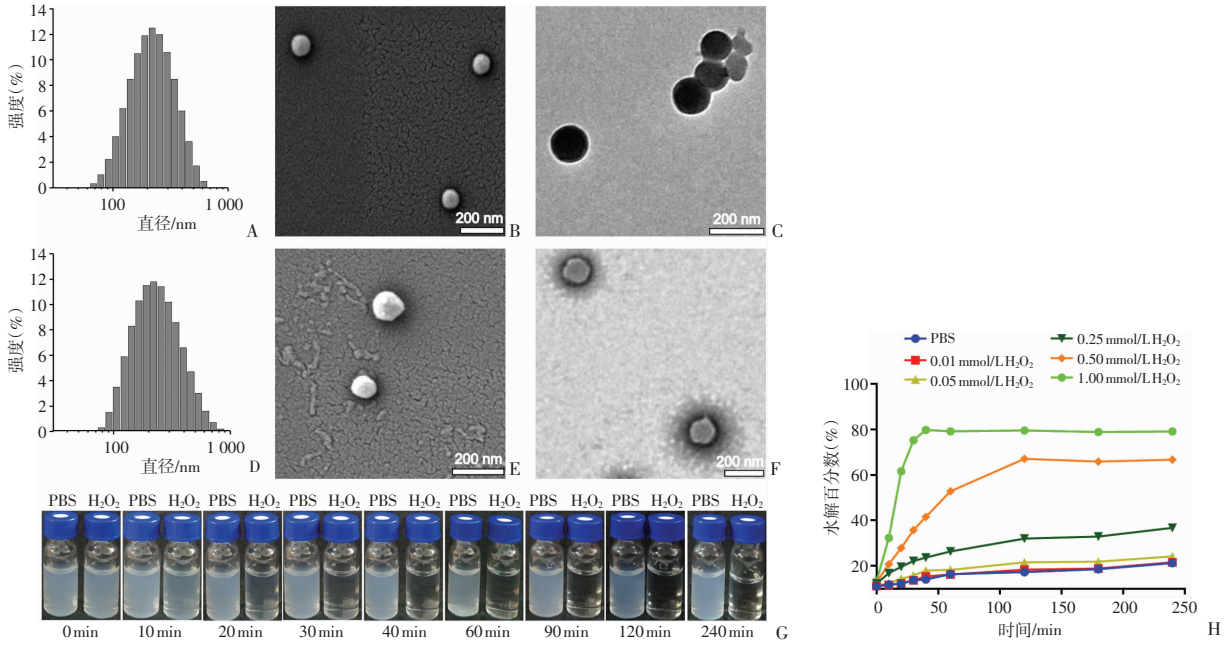
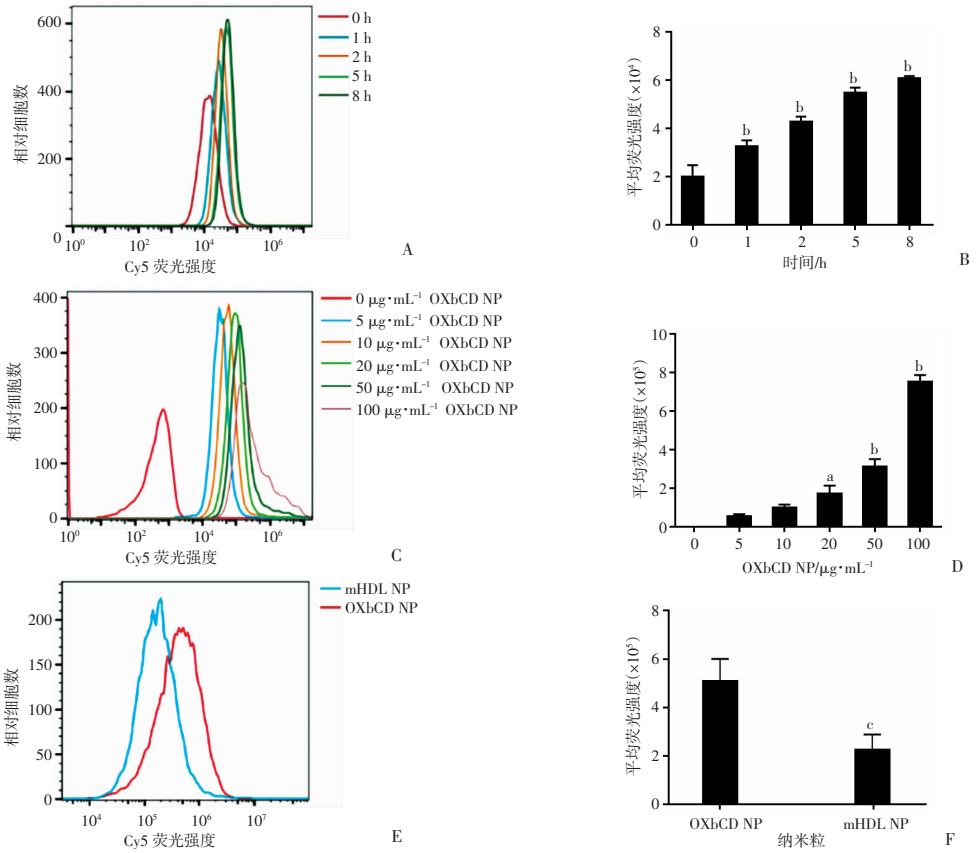


图 1　OXbCD 的氢核磁图谱(A)和红外图谱(B)



A~C:OXbCD NP 的粒径分布、扫描电镜和透射电镜;D~F:mHDL NP 的粒径分布、扫描电镜和透射电镜;G:OXbCD NP 分别在 PBS 和 1 mmol/L H_2O_2 中不同时间水解程度;H:OXbCD NP 在不同浓度 H_2O_2 中的水解曲线

图 2 纳米粒的表征和水解行为研究($n=3$)



A:细胞对 OXbCD NP 吞噬的时间依赖性;C:细胞对 OXbCD NP 吞噬的浓度依赖性;B、D:对应荧光强度的统计结果;E:细胞对两种纳米粒吞噬的流式分析结果;F:对应荧光强度的统计分析;a:$P<0.05$,与 0 μg/mL 组比较;b:$P<0.01$,与 0 h 或 0 μg/mL 比较;c:$P<0.05$,与 OXbCD NP 比较

图 3 流式细胞术检测 RAW264.7 细胞对 OXbCD NP 的吞噬作用($n=3$)

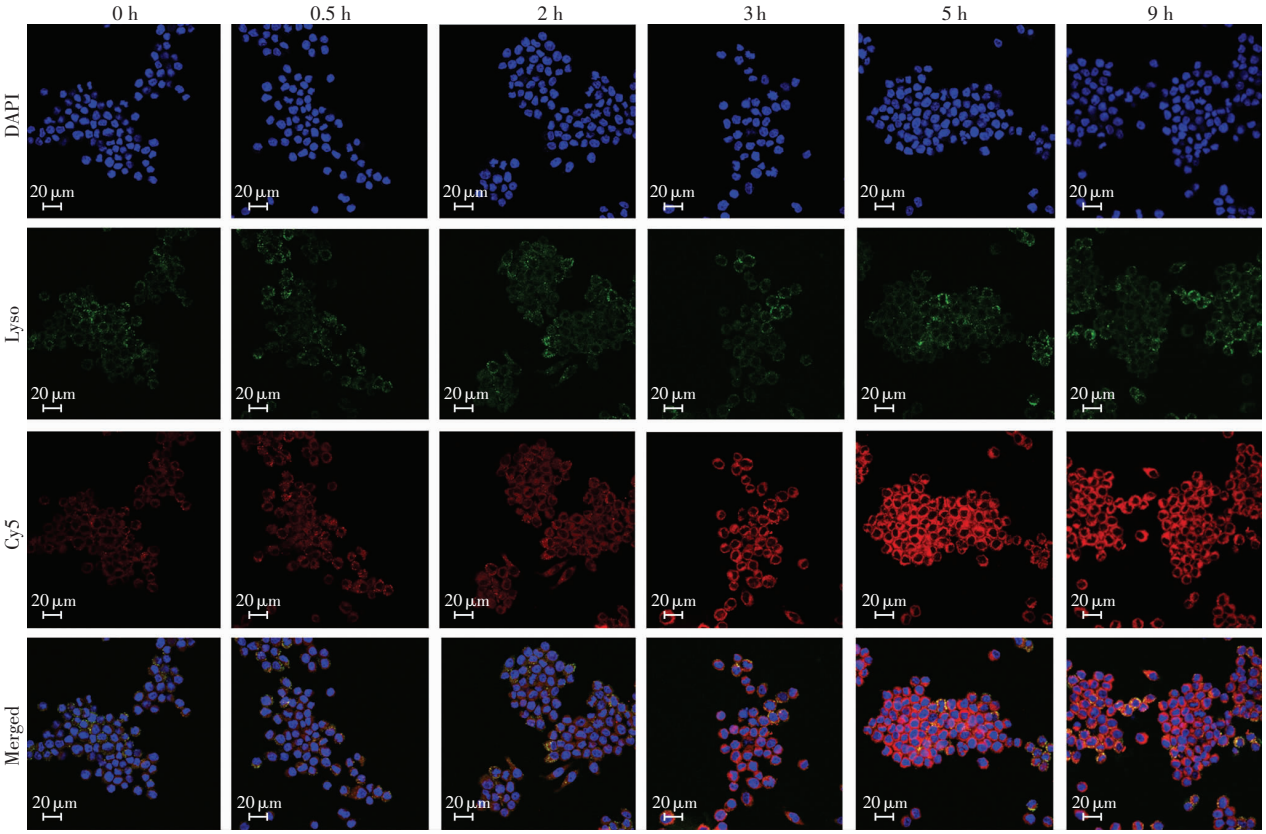


图 4　激光共聚焦观察细胞对 OXbCD NP 吞噬的时间依赖性

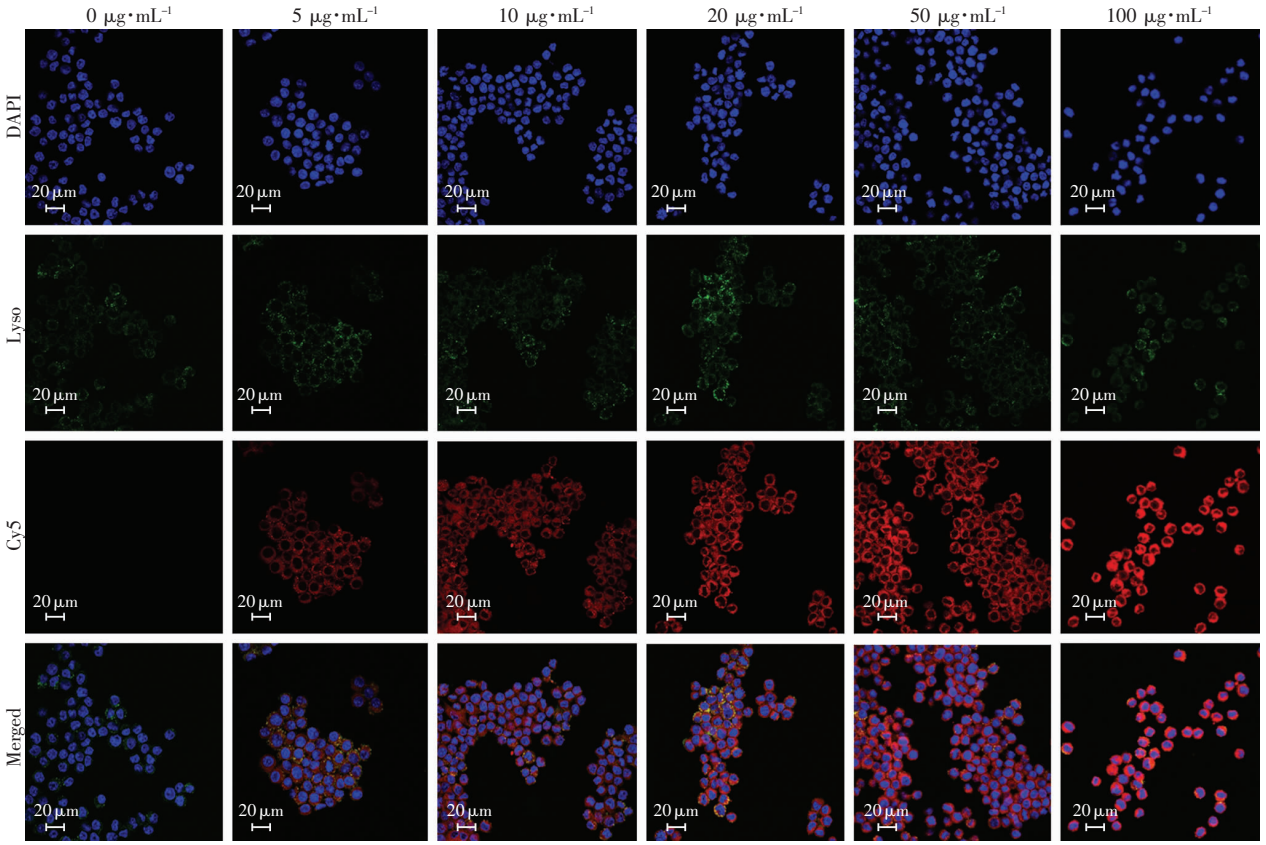
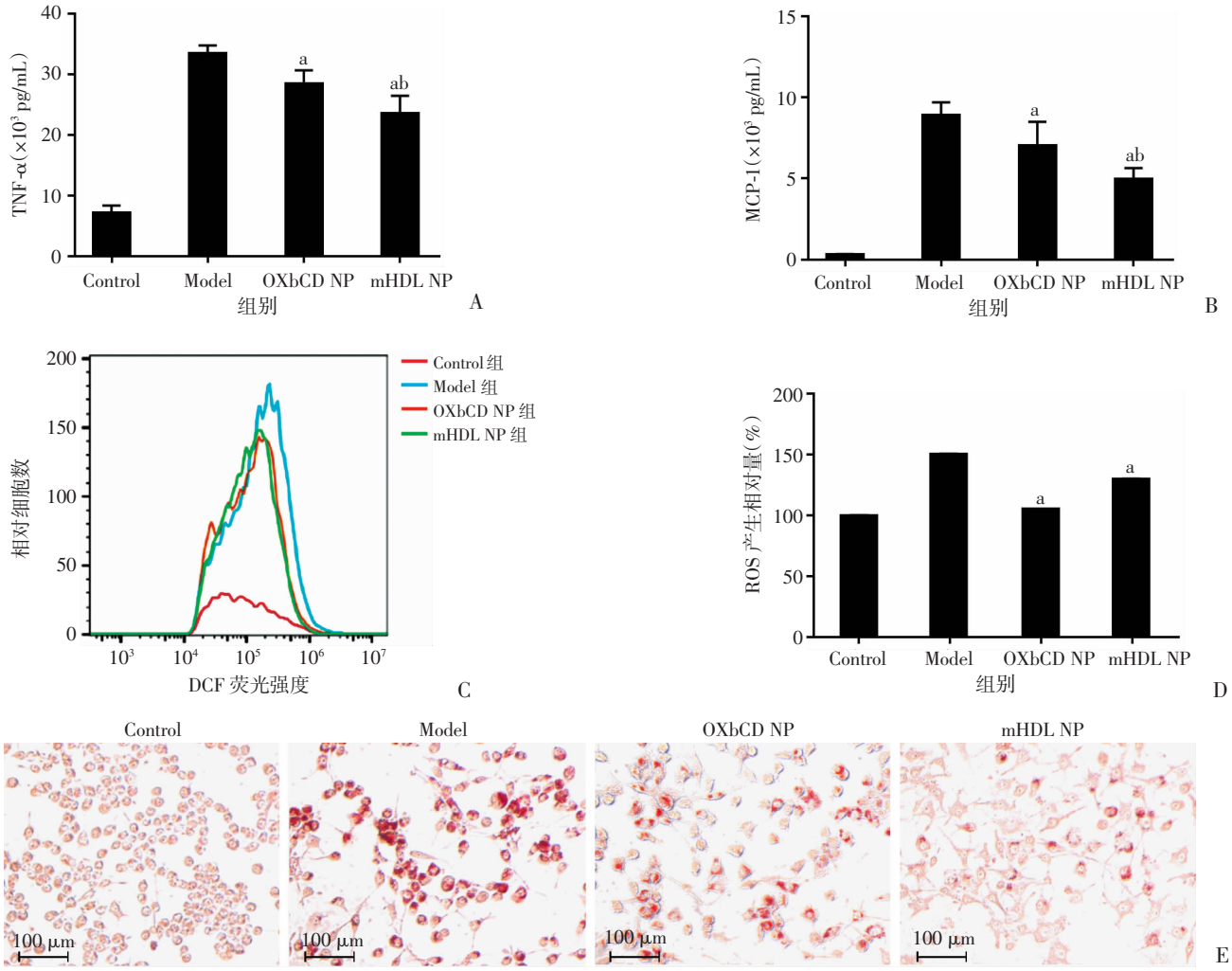


图 5　激光共聚焦观察细胞对 OXbCD NP 吞噬的浓度依赖性



A、B:细胞培养上清 TNF-α 和 MCP-1 含量统计;C、D:细胞内 ROS 含量流式分析和统计结果;E:油红染色观察不同纳米粒抑制泡沫细胞形成;a:$P<0.05$,与 Model 组比较;b:$P<0.05$,与 OXbCD NP 组比较

图 6 纳米粒抑制细胞炎症和氧化应激水平($n=3$)

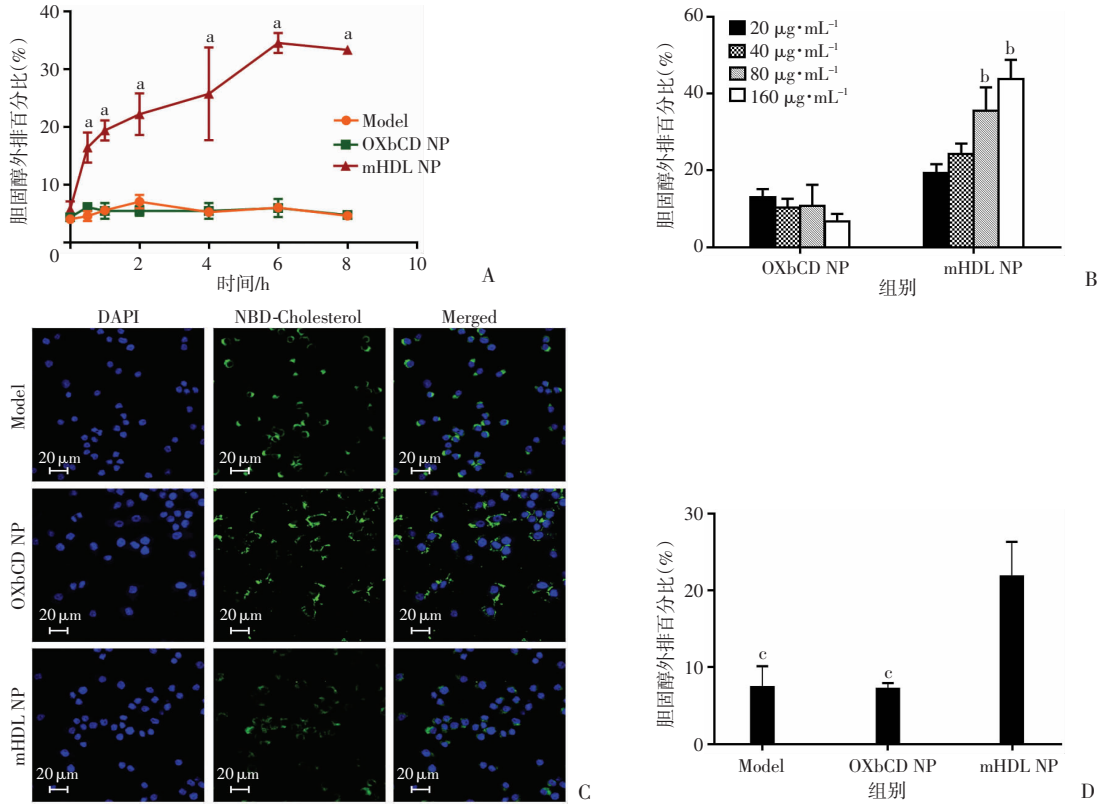
相对于 Model 组细胞内大量脂滴滞留,OXbCD NP 组和 mHDL NP 组细胞内脂滴聚集明显减少,说明两种纳米粒都具有抑制细胞泡沫化的作用,且 mHDL NP 的效果更为明显(图 6E)。

2.5 mHDL NP 促进细胞胆固醇外排

细胞实验发现(图 7A、B)mHDL NP 具有能够促进细胞胆固醇外排的能力,而且具有浓度[与 20 μg/mL 组比较,差异有统计学意义($P<0.05$)]和时间[与 0 h 组比较,差异有统计学意义($P<0.05$)]依赖性,但是随着孵育时间的延长,细胞外排胆固醇速率降低,细胞内外胆固醇含量趋于平衡;接着也运用激光共聚焦方法进一步证明,发现 OXbCD NP 处理的细胞胞内有大量的胆固醇(绿色)滞留,而 mHDL NP 处理的细胞胞内胆固醇聚集较少(图 7C)。选定纳米粒浓度和孵育时间进一步证明 mHDL NP 具有促进细胞胆固醇外排的作用,且比 OXbCD NP 外排率增加 15%左右($P<0.01$,图 7D)。证明 mHDL NP 具有天然 HDL 逆转胆固醇相似的作用。

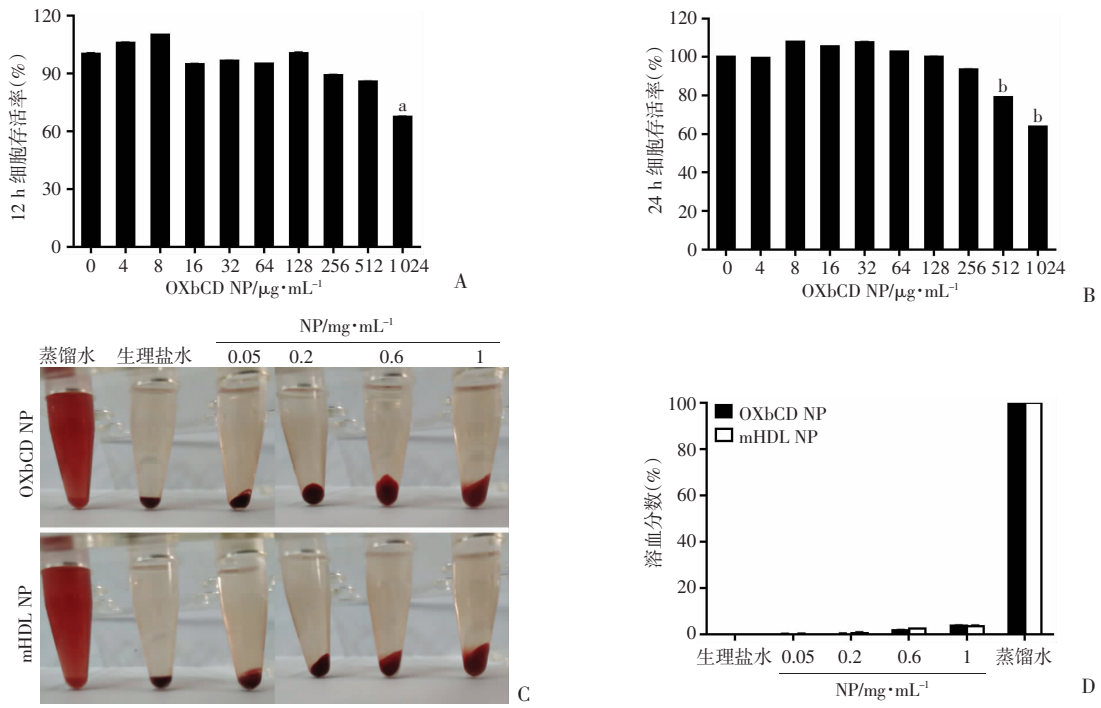
2.6 纳米粒的体外安全性评价

运用 CCK-8 评价了纳米粒对细胞的毒性,发现纳米粒与细胞共孵育 12 h,浓度达到 512 μg/mL 时细胞活力大于 80%,当浓度扩大到 1 024 μg/mL 时产生细胞毒性($P=0.003$),此条件下纳米粒浓度应不高于 1 024 μg/mL;将孵育时间延长至 24 h,浓度为 256 μg/mL 时细胞活力大于 90%,浓度扩大到 512 μg/mL 时产生明显的细胞毒性($P<0.01$,图 8),此条件下纳米粒浓度应不高于 512 μg/mL。体外溶血实验证明当纳米粒浓度到达 1 mg/mL 时,均未观察到溶血现象。初步证明通过该方法所制备的纳米粒在安全剂量范围内具有良好的生物安全性,可用于后续体内实验研究。



A:酶标仪检测细胞胆固醇外排率的时间曲线;B:不同浓度纳米粒对细胞胆固醇外排率的影响;C、D:激光共聚焦观察、酶标仪检测不同纳米粒对细胞胆固醇外排的影响;a:$P<0.05$,与 0 h 比较;b:$P<0.05$,与 20 μg/mL 比较;c:$P<0.05$,与 mHDL NP 组比较

图 7 mHDL NP 促进细胞胆固醇外排($n=3$)



A、B:CCK-8 检测纳米粒在细胞 12、24 h 对细胞的毒性($n=5$);C、D:体外考察纳米粒的溶血现象和对应溶血分数分析;a:$P<0.05$,b:$P<0.01$,与 0 μg/mL 比较

图 8 纳米粒体外安全性评价

3 讨论

炎症局部特征微环境是构建炎症响应性纳米探针和纳米药物的依据。本研究中,基于 ROS 响应性材料 OXbCD,我们通过自组装纳米沉淀法制备了 ROS 响应性纳米粒 OXbCD NP,并在体外水解研究中证实其具有较好的 ROS 响应性水解性能。通过仿生策略在 OXbCD NP 表面修饰了仿 HDL 结构,不仅能够增强其体内生物相容性,而且能够赋予纳米粒胆固醇逆转运作用,使得构建的纳米粒 mHDL NP 兼具抗炎、降脂的作用;同时可以作为响应性纳米递送系统实现抗炎药物的靶向释放。这些结果都充分显示了仿 HDL 纳米粒在抗动脉粥样硬化中的作用优势,为后续在体内治疗动脉粥样硬化提供了良好的实验基础。

此外,我们还可以通过表面修饰的方式引入更多的其他不同靶向分子的方式,实现 AS 的多重靶向治疗。另一方面,除了 ROS 响应性材料外,其他类型的炎症响应性材料,如 pH 响应性材料、酶响应性材料以及多重响应性材料也越来越多地被用于炎症相关疾病的治疗之中[17-18]。同时,内源性细胞,如白细胞、血小板等在炎症中的特殊作用也指引研究者构建了众多的仿生粒子,实现了更为高效的递送。我们有理由相信,随着纳米医学的飞速发展和对炎性疾病发病机制的研究,更为智能的纳米递送系统和纳米药物将会被应用于动脉粥样硬化的治疗中。

参考文献:

[1] AL-MAMARI A. Atherosclerosis and physical activity[J]. Oman Med J, 2009,24(3):173-178. DOI:10.5001/omj.2009.34.

[2] CERVADORO A, PALOMBA R, VERGARO G, *et al*. Targeting inflammation with nanosized drug delivery platforms in cardiovascular diseases: immune cell modulation in atherosclerosis[J]. Front Bioeng Biotechnol, 2018,6: 177. DOI:10.3389/fbioe.2018.00177.

[3] BELDMAN T J, MALINOVA T S, DESCLOS E, *et al*. Nanoparticle-aided characterization of arterial endothelial architecture during atherosclerosis progression and metabolic therapy [J]. ACS Nano, 2019,13(12):13759-13774. DOI:10.1021/acsnano.8b08875.

[4] DUIVENVOORDEN R, SENDERS M L, VAN LEENT M M T, *et al*. Nanoimmunotherapy to treat ischaemic heart disease [J]. Nat Rev Cardiol, 2019, 16(1): 21-32. DOI:10.1038/s41569-018-0073-1.

[5] DUIVENVOORDEN R, TANG J, CORMODE D P, *et al*. A statin-loaded reconstituted high-density lipoprotein nanoparticle inhibits atherosclerotic plaque inflammation[J]. Nat Commun, 2014, 5: 3065. DOI:10.1038/ncomms4065.

[6] GHARAGOZLOO M, MAJEWSKI S, FOLDVARI M. Therapeutic applications of nanomedicine in autoimmune diseases: from immunosuppression to tolerance induction [J]. Nanomed-Nanotechnol Biol Med, 2015, 11(4): 1003-1018. DOI:10.1016/j.nano.2014.12.003.

[7] LOBATTO M E, FAYAD Z A, SILVERA S, *et al*. Multimodal clinical imaging to longitudinally assess a nanomedical anti-inflammatory treatment in experimental atherosclerosis [J]. Mol Pharm, 2010, 7(6): 2020-2029. DOI:10.1021/mp100309y.

[8] MULDER W J, JAFFER F A, FAYAD Z A, *et al*. Imaging and nanomedicine in inflammatory atherosclerosis[J]. Sci Transl Med, 2014, 6(239): 239sr1. DOI:10.1126/scitranslmed.3005101.

[9] BARAZZA A, BLACHFORD C, EVEN-OR O, *et al*. The complex fate in plasma of gadolinium incorporated into high-density lipoproteins used for magnetic imaging of atherosclerotic plaques[J]. Bioconjug Chem, 2013, 24(6): 1039-1048. DOI:10.1021/bc400105j.

[10] CORMODE D P, SKAJAA T, VAN SCHOONEVELD M M, *et al*. Nanocrystal core high-density lipoproteins: a multimodality contrast agent platform[J]. Nano Lett, 2008,8(11): 3715-3723. DOI:10.1021/nl801958b.

[11] EL ANDALOUSSI S, MÄGER I, BREAKEFIELD X O, *et al*. Extracellular vesicles: biology and emerging therapeutic opportunities[J]. Nat Rev Drug Discov, 2013, 12(5): 347-357. DOI:10.1038/nrd3978.

[12] MULDER W J M, VAN LEENT M M T, LAMEIJER M, *et al*. High-density lipoprotein nanobiologics for precision medicine [J]. Acc Chem Res, 2018, 51(1): 127-137. DOI:10.1021/acs.accounts.7b00339.

[13] BODEN W E. High-density lipoprotein cholesterol as an independent risk factor in cardiovascular disease: assessing the data from Framingham to the Veterans Affairs High: Density Lipoprotein Intervention Trial[J]. Am J Cardiol, 2000, 86(12A): 19L-22L. DOI:10.1016/s0002-9149(00)01464-8.

[14] FAZIO S, PAMIR N. HDL particle size and functional heterogeneity[J]. Circ Res, 2016, 119(6): 704-707. DOI:10.1161/CIRCRESAHA.116.309506.

[15] FEIG J E, RONG J X, SHAMIR R, *et al*. HDL promotes rapid atherosclerosis regression in mice and alters inflammatory properties of plaque monocyte-derived cells[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2011, 108(17): 7166-7171. DOI:10.1073/pnas.1016086108.

[16] ROTHBLAT G H, PHILLIPS M C. High-density lipoprotein heterogeneity and function in reverse cholesterol transport [J]. Curr Opin Lipidol, 2010, 21(3):229-238. DOI:10.1097/mol.0b013e328338472d.

[17] ZHANG R J, LIU R F, LIU C, *et al*. A pH/ROS dual-responsive and targeting nanotherapy for vascular inflammatory diseases[J]. Biomaterials, 2020, 230: 119605. DOI:10.1016/j.biomaterials.2019.119605.

[18] CARLINI A S, GAETANI R, BRADEN R L, *et al*. Enzyme-responsive progelator cyclic peptides for minimally invasive delivery to the heart post-myocardial infarction[J]. Nat Commun, 2019, 10(1): 1735. DOI:10.1038/s41467-019-09587-y.

(收稿:2020-01-19;修回:2020-02-29)

(编辑 张 维)