DOI:10.16016/j.2097-0927.202201174

自组装新型纳米药物的构建及其靶向治疗子痫前期的作用评价

张思祺,李 科,贾小燕,张瀚文,成 娟 400016 重庆,重庆医科大学附属第一医院产科

[**摘要**] **目的** 构建具有体内降压效果和胎盘靶向性的纳米药物,探讨其在胎盘的靶向效果和体内外治疗子痫前期(preeclampsia,PE)的作用。**方法** 应用载体材料聚乳酸-羟基乙酸共聚物(PLGA)和降压药物硝苯地平(nifedipine),通过自组装纳米沉淀法制备纳米药物(PN NP),利用化学键合的方式将胎盘靶向肽 plCSA-BP 连接到 PN NP 表面形成靶向纳米药物(pl-PN NP)。对纳米药物的物理、化学性质进行表征,选用人绒毛膜滋养层细胞系 HTR8 进行细胞实验,采用激光共聚焦和流式细胞仪考察滋养层细胞吞噬纳米药物的功能以及纳米药物抗凋亡、抗氧化应激效果。通过大鼠子宫缺血灌注动物模型(reduced uterine perfusion pressure, RUPP)探讨纳米药物的胎盘靶向性及其在子痫前期大鼠模型中的治疗效果,评价纳米药物对胎鼠发育的影响。**结果** 粒径分布和电镜检测结果显示:PN NP 和 pl-PN NP 粒径分布狭窄,粒径分别为(160.9±5.3) nm 和(163.5±3.4) nm,表面电荷分别为(-45.5±2.6) mV 和(-48.3±4.5) mV,纳米药物为球形且分布均匀。体外细胞实验结果证明 HTR8 细胞对纳米药物的吞噬具有时间和浓度依赖性,且纳米药物能显著抑制 H_2O_2 刺激下的细胞凋亡和氧化应激水平($P<0.05$),并且 pl-PN NP 较 PN NP 具有更好的效果。体内动物实验结果显示:与硝苯地平相比,PN NP 和 pl-PN NP 能显著降低子痫前期大鼠模型的血压、蛋白尿、子宫动脉阻力指数及炎症因子(IL-6、TNF-α)的表达($P<0.05$),增加其抗氧化应激相关蛋白(UCP-1、Nrf-2)的表达($P<0.05$)。纳米药物可改善母鼠肾脏和胎盘血流,增加胎鼠和胎盘质量,以逆转胎鼠发育障碍。与 PN NP 比较,pl-PN NP 在体内降低血压、蛋白尿、血流阻力、炎症因子、氧化应激水平,改善血流,增加胎鼠和胎盘质量的效果更显著($P<0.05$)。**结论** 使用自组装纳米沉淀法成功合成纳米降压药物(PN NP)和具有胎盘靶向性的纳米降压药物(pl-PN NP),在细胞水平和动物模型中证明 PN NP 和 pl-PN NP 具有治疗子痫前期的效果。

[**关键词**] 纳米药物;胎盘靶向性;子痫前期;硝苯地平
[**中图法分类号**] R714.245;R944.9;R972.4 [**文献标志码**] A

Construction of self-assembled nanomedicine and evaluation on its targeting role in preeclampsia treatment

ZHANG Siqi, LI Ke, JIA Xiaoyan, ZHANG Hanwen, CHENG Juan Department of Obstetrics, the First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing, 400016, China

[**Abstract**] **Objective** To construct nanomedicine with antihypertensive effect and explore its targeting ability and therapeutic efficacy on preeclampsia (PE) *in vitro* and *in vivo*. **Methods** The carrier material poly (lactic-co-glycolic acid, PLGA) encapsulated nifedipine was self-assembled to construct a new nanomedicine (PN NP), and the placenta-targeting peptide (plCSA-BP) was linked to the surface of the nanomedicine (named pl-PN NP) by chemical bonding. Microscopy and laser particle analyzer were utilized to characterize these nanomedicines (PN NP and pl-PN NP). Confocal laser scanning microscopy (CLSM) and flow cytometry were used to investigate the phagocytosis, anti-apoptosis and antioxidant levels in HTR8 cells after treatment of different doses of nanomedicines. The reduced uterine perfusion pressure (RUPP)

[**基金项目**] 国家自然科学基金面上项目(82171662)
[**通信作者**] 成 娟,E-mail:juancheng1201@163.com

2097-0927/Copyright © 2022, 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/)

model was used to explore the targeting and therapeutic effect of PN NP and pl-PN NP in preeclampsia rats, and their influence on fetal development. **Results** The nanoparticles, PN NP and pl-PN NP are in a well-defined spherical shape, in a narrow particle size distribution, at a mean diameter of 160.9±5.3 and 163.5±3.4 nm, and with a surface charge of −45.5±2.6 and −48.3±4.5 mV, respectively. *In vitro* cell experiments showed that HTR8 cells phagocytosed the nanoparticles in a time- and concentration-dependent manner, and they inhibited cell apoptosis and oxidative stress after H_2O_2 stimulation ($P<0.05$), with pl-PN NP showing better effect than PN NP. *In vivo* animal experiments showed that the PN NP and pl-PN NP treatment groups had significantly reduced blood pressure ($P<0.05$), proteinuria level ($P<0.05$) and uterine artery blood flow resistance index (UARI, $P<0.05$) and expression levels of inflammatory factors IL-6 and TNF-α ($P<0.05$), and increased expression levels of anti-oxidative stress-related proteins UCP-1 and Nrf-2 ($P<0.05$) when compared with the nifedipine group. Moreover, these nanoparticles improved blood supply of the kidneys and placenta, increased fetal and placental weight, and alleviated developmental disorders of fetus. And pl-PN NP exerted better effects on blood pressure, proteinuria, UARI, inflammatory factors, oxidative stress, blood supply and weights of placenta and fetus than PN NP ($P<0.05$). **Conclusion** Nanomedicine loaded with nifedipine (PN NP) and the placenta-targeted nanomedicine (pl-PN NP) are successfully synthesized, and PN NP and pl-PN NP show efficacy in treatment of preeclampsia at both cell and animal experiments.

[**Key words**] nanomedicine; placental targeting; preeclampsia; nifedipine

Supported by the General Program of National Natural Science Foundation of China (82171662). Corresponding author: CHENG Juan, E-mail: juancheng1201@163.com

子痫前期(preeclampsia,PE)是指妊娠20周以后出现的以高血压、蛋白尿和水肿为特征的妊娠期常见疾病[1]。全球子痫前期的发病率为3%~8%[2],近18%的孕产妇死亡由子痫前期导致。临床上常用阿司匹林、低分子肝素以及钙通道阻滞剂来预防和治疗子痫前期,但这些药物普遍存在药物半衰期短、潜在出血风险、血小板减少等副作用,手术终止妊娠被认为是子痫前期唯一认可的治疗方法[3-4]。尽管对于子痫前期的机制研究已经取得进展,但子痫前期的预防和治疗仍然存在巨大的挑战。

近年来,随着纳米技术的发展,有部分利用纳米颗粒诊断和治疗子痫前期的研究陆续报道[5-6]。例如利用脂质体、外泌体结合RNA体内干预治疗子痫前期,相较于传统制剂具有提高生物利用度、治疗效果的功能。此外,有研究表明硫酸软骨素(chondroitinsulfatea,CSA)是一种存在于胎盘滋养层细胞表面的蛋白质,合成多肽plCSA-BP可有效靶向胎盘[7-8]。因此,本研究旨在利用材料PLGA、钙通道阻滞剂硝苯地平[9-11]和胎盘靶向肽plCSA-BP,通过自组装纳米沉淀法形成具有胎盘靶向功能和抗子痫前期的纳米药物(PN NP,pl-PN NP),提高其药物生物利用度,将药物选择性地递送至胎盘部位,改善胎盘血供,减轻其炎症和氧化应激水平,降低药物副作用,从而达到最佳的治疗效果,为子痫前期的防治研究提供更多选择。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

大豆卵磷脂(Lecithin)购自日本Tokyo Chemical Industry公司;二硬脂酰磷脂酰乙酰胺-甲氧基乙二醇-羧基(DSPE-PEG-COOH)购自瑞士Corden Pharma公司;聚乳酸-羟基乙酸共聚物(PLGA)、1-乙基-(3-二甲基氨基丙基)碳酰二亚胺(EDC)、N-羟基丁二酰亚胺(NHS)、4,6-二脒基-2-苯基吲哚(DAPI)均购自Sigma-Aldrich公司;硝苯地平(nifedipine)原料药购自索莱宝生物科技有限公司;Cy3-NHS活化酯购自西安瑞禧生物科技有限公司;胎盘CSA结合肽(plCSA-BP,EDVK-DINFDTKEKFLAGCLIVSFHEGKC)购自上海强耀生物科技有限公司;RPMI 1640培养基、胎牛血清、青霉素-链霉素双抗、胰酶均购自Gibco公司;SYBR Green购自Bimake公司;逆转录试剂盒购自Med-ChemExpress(MCE)公司;DHE、CCK-8检测试剂盒购自Beyotime;Lyso-tracker green DND-26购自Invitrogen公司;TNF-α、IL-6、UCP-1、Nrf-2购自美国Proteintech公司。

1.2 方法

1.2.1 自组装纳米药物的合成与表征 取4 mg卵磷脂和6 mg DSPE-PEG-COOH溶于0.4 mL乙醇中,加去离子水至10 mL,65 ℃下磁力搅拌30 min作为水相;50 mg PLGA和10 mg硝苯地平原料药溶于2 mL

乙腈作为油相,缓慢滴加在水相中,室温搅拌2 h,得到硝苯地平纳米药物(PN NP)。将1 mg Cy3荧光染料溶液溶解在上述油相中,同样处理后可得到Cy3荧光纳米粒(Cy3-PN NP)。取18 mg上述纳米药物溶于6 mL 0.1 mol/L的MES缓冲液(pH=5.5)中,同时加入15 mg的EDC和5 mg的NHS来激活羧基,室温搅拌15 min后加入含有3 mg plCSA-BP的去离子水(500 μL),调整混合物pH至7.0~8.0,室温搅拌过夜。终产物16 000 r/min离心去除多余的杂质,最后得到载有plCSA-BP的纳米药物(pl-PN NP),同样的方法加入Cy3荧光材料得到Cy3-pl-PN NP。通过激光粒度仪(DLS)测定纳米药物粒径大小、分布及表面电位。采用透射电子显微镜(TEM)、扫描电子显微镜(SEM)观察纳米药物形态。BCA法测定plCSA-BP结合效率。

1.2.2 纳米药物硝苯地平含量测定 称取硝苯地平25 mg,加入100 mL无水乙醇,用吐温80水溶液(0.4%)稀释至50 μg/mL,配置不同浓度的硝苯地平标准品(5、10、15、20、30、35 μg/mL)在333 nm处测定不同标准品光密度,计算其标准曲线。称取适量PN NP和pl-PN NP,用pH=6.8的磷酸盐缓冲稀释成适当的浓度,测定光密度计算浓度(C),测定硝苯地平在纳米药物中的含量及包封率。

1.2.3 纳米药物体外生物学评价

1.2.3.1 纳米药物细胞吞噬行为研究 激光共聚焦显微镜检测HTR8细胞[12-14]对PN NP、pl-PN NP的吞噬:1 mL(1×10^5/mL)细胞悬液接种在细胞爬片上,孵育过夜,加入含有50 μg/mL Cy3-PN NP和Cy3-pl-PN NP的培养基,孵育不同时间后,用甲醛固定,50 nmol/L的溶酶体标记Lyso-tracker green DND-26活细胞染色1 h,DAPI复染,封片后,采用激光共聚焦显微镜观察细胞对纳米药物的时间依赖性,Zen软件处理图像。采用流式细胞仪观察HTR8细胞对PN NP、pl-PN NP的吞噬:2 mL(2×10^5/mL)细胞悬液接种在6孔板中,孵育过夜,加入含有不同浓度的Cy3-PN NP或Cy3-pl-PN NP培养基,孵育2 h,胰酶消化后,收取细胞悬液,1 000 r/min离心5 min后重悬,取200 μL细胞悬液上机检测细胞对纳米药物吞噬的浓度依赖性;或加入含有50 μg/mL Cy3-PN NP和Cy3-pl-PN NP,孵育不同时间,胰酶消化后,收集细胞悬液,采用流式细胞仪检测细胞对纳米药物吞噬的时间依赖性。

1.2.3.2 纳米药物体外抑制细胞凋亡效果 在6孔板中加入2 mL HTR8细胞(2×10^5/mL),RPMI 1640培养基(含有10%胎牛血清)孵育过夜,去除培养基后,加入2 mL含有10 μg/mL硝苯地平培养基、含有10 μg/mL硝苯地平的PN NP、pl-PN NP培养基或空白培养基(Model组),孵育24 h后,弃去培养基,加入2 mL含有150 μmol/L的H_2O_2培养基孵育12 h,以未用H_2O_2培养基刺激的细胞作为阴性对照(Control组)。吸去上清,胰酶(不含EDTA)消化,FITC-Annexin-V和PE-PI双染后,流式细胞仪检测细胞凋亡。

1.2.3.3 细胞内活性氧水平测定 1 mL(2×10^5/mL)HTR8细胞接种在12孔板中,培养过夜;加入含有1 mL 10 μg/mL硝苯地平培养基、含有10 μg/mL硝苯地平的PN NP、pl-PN NP的培养基或空白培养基(Model组),孵育24 h,PBS清洗后,加入1 mL 150 μmol/L的H_2O_2培养基孵育12 h,以未用H_2O_2培养基刺激的细胞作为阴性对照(Control组);PBS清洗后,加入5 μmol/L DHE活性氧探针(碧云天)的培养基孵育30 min,重悬细胞,流式细胞仪检测(Ex/Em:535 nm/610 nm)。1 mL(1×10^5/mL)HTR8细胞接种在细胞爬片上,培养过夜,上述试剂培养处理后,5 μmol/L DHE活性氧探针染色,DAPI复染,甲醛固定封片后激光共聚焦显微镜下观察。

1.2.3.4 体外纳米药物安全性评价 CCK-8细胞毒性检测:HTR8细胞(1×10^4/mL)接种在96孔板中,孵育过夜,加入0、2、4、8、16、32、64、128、256、512、1 024 μg/mL PN NP或pl-PN NP的培养基,孵育24 h后,加入CCK-8溶液孵育1 h,在450 nm处测定光密度。体外溶血实验检测:雌性SD大鼠麻醉后取血于EDTA抗凝管中,1 000 r/min离心10 min后得到红细胞悬液,取200 μL的红细胞悬液、800 μL不同浓度的纳米药物混合室温孵育24 h后,1 000 r/min离心10 min,PBS和双蒸水(water)与红细胞混合作为阴性和阳性对照,吸取上清液测定其在541 nm的光密度,并计算其溶血分数=$[D(541)_{实验组}-D(541)_{阴性组}]/[D(541)_{阳性组}-D(541)_{阴性组}]\times100\%$。

1.2.4 纳米药物体内疗效评价

1.2.4.1 实验动物 58只IVC级SD雌鼠由重庆医科大学动物实验中心提供[许可证号:SCXK(渝)2018-0003],鼠龄12~16周,体质量(250±20)g。每晚将雌鼠与性成熟雄性大鼠按2∶1比例合笼,隔天取雌鼠的阴道分泌物涂片后在显微镜下观察,见精子者定为孕0 d(E0)。

1.2.4.2 实验动物模型建立 国内外有较多妊娠期高血压的动物模型研究[15-17],其中传统的子宫缺血

灌注模型(reduced uterine perfusion pressure, RUPP)[18]可以针对性地引发胎盘缺血缺氧,接近临床上常见的子痫前期发病机制,并且使用手术方法替代药物干预、基因缺陷等方法建模可以减少其他药物对于纳米药物治疗的干扰。因此,本研究采用传统的 RUPP 手术模型法:孕 14 大鼠(E14)异氟烷麻醉后置于恒温手术台,沿下腹正中线开腹,暴露腹主动脉下端、子宫以及卵巢动脉,于腹主动脉下段近髂动脉分叉起始处放置银夹 1 枚钳夹血管,左右两侧子宫动脉第一分叉前分别置一枚银夹,研究表明该方法可使子宫血流灌注减少到 40%[19],致使胎盘处于缺血缺氧状态,依次缝合肌层和皮肤后常规消毒关腹。

1.2.4.3 实验动物分组 大鼠按照随机数字表法分成 5 组:假手术组(Sham 组,仅开腹后关腹,术后静脉注射同等体积的 PBS)、RUPP 组(子痫前期大鼠模型组,术后静脉注射同等体积的 PBS),硝苯地平组[RUPP 造模后给予 0.75 mg/(kg·d)硝苯地平静脉注射,1 次/d,共 1 周]、PN NP 组[RUPP 造模后给予含 0.75 mg/(kg·d)硝苯地平的 PN NP 静脉注射,1 次/d,共 1 周]、pl-PN NP 组[RUPP 造模后给予含 0.75 mg/(kg·d)硝苯地平的 pl-PN NP 静脉注射,1 次/d,共 1 周],每组 6 只。药物注射 1 周后,在妊娠第 20 天(E20)行剖宫产用于后续实验。

1.2.4.4 免疫荧光染色 母鼠 E15(RUPP 造模后 1 d)静脉注射 Cy3-PN NP 和 Cy3-pl-PN NP,相同剂量 PBS 静脉注射作为对照组,24 h 后取胎盘组织 OCT 包埋,切至 8 μm 纵切面。切片解冻,用 4%甲醛溶液固定,用 0.1% Triton X-100 处理。10%BSA 封闭载玻片,分别与 CK7 抗体在 4 ℃封闭过夜,FITC-山羊抗兔 IgG 二抗封闭 2 h,DAPI 染核,荧光显微镜拍摄图像。

1.2.4.5 血压、蛋白尿、超声及妊娠结局评价 血压(BP)测量:于妊娠第 19 天(E19)20:00-21:00 及 E20 8:00-9:00 清醒状态下无创测量动脉血压,取平均值。尿蛋白(proteinuria):E18 放置大鼠代谢笼,留取 24 h 尿液,BCA 法测量 24 h 尿蛋白定量。超声检查:E20 将大鼠腹部剃毛,使用小动物超声系统测量双侧子宫测量收缩期峰值流速(peak systolic velocity, PSV)和舒张末期流速(end diastolic blood flow velocity, EDV),使用公式计算子宫动脉阻力指数(uterine artery blood flow resistance index, UARI) = (PSV-EDV)/PSV。胎鼠状态判断:E20 进行超声测量后剖宫产取胎,观察胎鼠有无畸形,分别对胎鼠和胎盘称取质量,一部分胎盘以及母鼠和胎鼠的主要器官放入甲醛固定,一部分胎盘液氮冻存后-80 ℃保存用于后续实验。

1.2.4.6 HE 染色 取甲醛固定好的胎盘、母鼠和胎鼠的主要器官,梯度酒精脱水、石蜡包埋、切片、脱蜡、苏木精伊红染色、再次梯度脱水、固封,在显微镜下观察并拍照。

1.2.4.7 RT-qPCR 检测 TRIzol 试剂提取各组胎盘组织,并测量 RNA 浓度和纯度。反转录试剂盒合成 cDNA,用荧光染料法 SYBR Green 进行 RT-qPCR,$2^{-\Delta\Delta Ct}$ 计算其表达水平,各引物序列见表 1。

表 1 相关 PCR 引物序列

基因	序列	产物大小/bp
IL-6	5′-AGGAACGAAAGTCAACTCCA-3′	141
	5′-TTGTGAAGTAGGGAAGGCA-3′	
TNFα	5′-TTCATCCGTTCTCTACCCA-3′	138
	5′-GAGCCACAATTCCCTTTCT-3′	
UCP1	5′-AGACAGAAGGATTGCCGAAAC-3′	169
	5′-TTGGACCGTATCGTAGAGGC-3′	
Nrf2	5′-GGCACGGTGGAGTTCAATG-3′	151
	5′-GTGTTGGCTGTGCTTTAGGTC-3′	

1.3 统计学分析

采用 SPSS 20.0 统计软件,结果以 $\bar{x}\pm s$ 表示,各组数据近似正态分布,对于多组间差异比较采用单因素分析,两组间比较采用非配对 t 检验。$P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

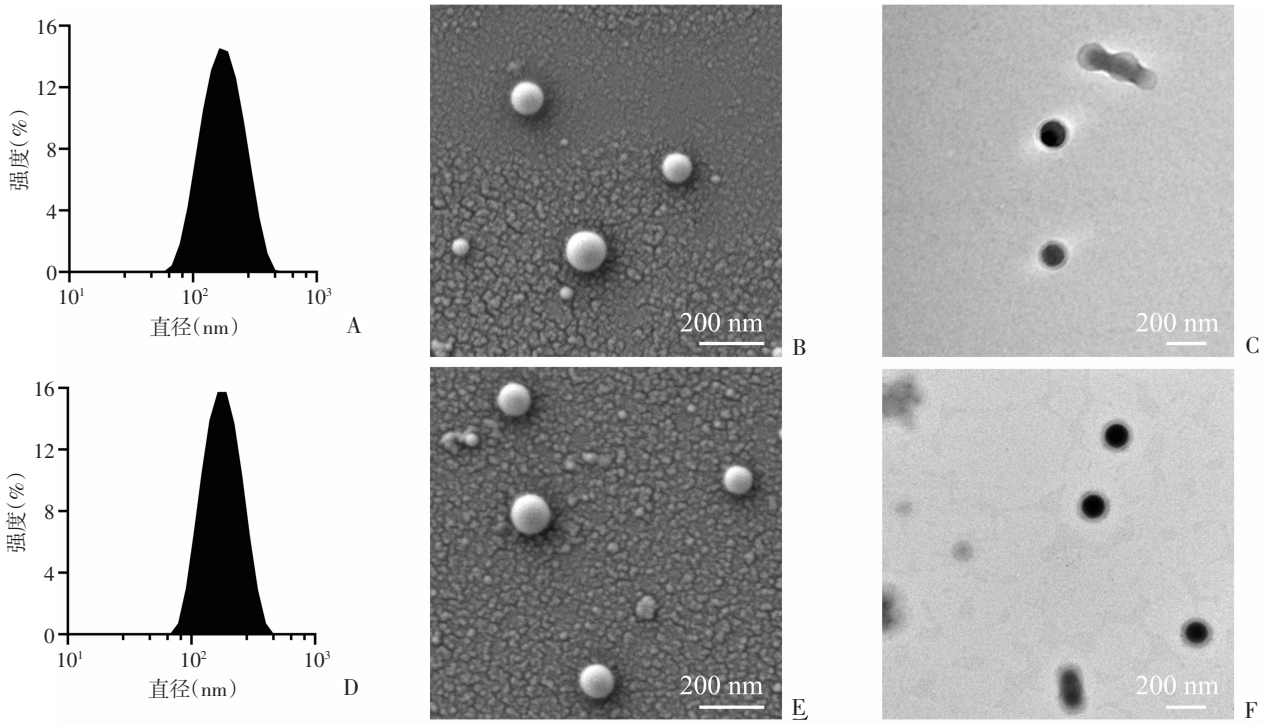
2 结果

2.1 胎盘靶向性纳米药物的理化性质

扫描电镜和透射电镜(图 1)观察显示 PN NP 和 pl-PN NP 分布均匀为球形,表 2 显示 PN NP 和 pl-PN NP 的粒径、电位、PDI、包封率、载药量和结合率。紫外吸光光度测得硝苯地平在 PN NP 和 pl-PN NP 的药物含量分别为 40.3%和 36.8%(质量比),硝苯地平包封率分别为 64.2%和 56.8%(质量比)。plCSA-BP 的结合效率分别为 0 和(51.3±4.3)%(质量比)。

2.2 HTR8 细胞对纳米药物的吞噬作用

激光共聚焦显微镜观察结果显示:随着时间的增加,Cy3 在细胞体内聚集,并且与溶酶体共定位(图 2),表明细胞吞噬纳米药物是通过溶酶体途径。通过比较细胞对 PN NP 和 pl-PN NP 的吞噬能力发现:细胞对 pl-PN NP 的吞噬能力显著上升。采用流式细胞仪检测 HTR8 对 PN NP 和 pl-PN NP 的吞噬能力,如图 3 所示:HTR8 吞噬纳米药物呈浓度和时间的依赖性,并且在 pl-PN NP 组表现出更强的吞噬效果($P<0.05$),证明 pl-PN NP 组对于胎盘滋养细胞层的靶向性。



A~C:PN NP 的粒径分布及扫描电镜、透射电镜观察;D~F:pl-PN NP 的粒径分布及扫描电镜、透射电镜观察

图 1 胎盘靶向性纳米药物的理化性质

表 2 胎盘靶向性纳米药物的理化性质($n=3$, $\bar{x}\pm s$)

纳米药物	粒径/nm	Zeta 电位/mV	PDI	包封率(%)	载药量(%)	结合率(%)
PN NP	160.9±5.3	-45.5±2.6	0.133	64.2	40.3	-
pl-PN NP	163.5±3.4	-48.3±4.5	0.156	56.8	36.8	51.3±4.3

2.3 纳米药物体外抗凋亡和抗氧化应激评价

子痫前期患者体内处于氧化应激状态,为了探讨纳米药物对于氧化应激的影响,用 H_2O_2 诱导 HTR8 建立体外氧化应激模型,不同药物处理后结果显示:与 Model 组相比,两种纳米药物均能减少细胞凋亡水平($P<0.05$,图 4A、B),并且 pl-PN NP 降低效果比 PN NP 更为显著($P<0.05$),pl-PN NP 组比 PN NP 组降低 5.08%。

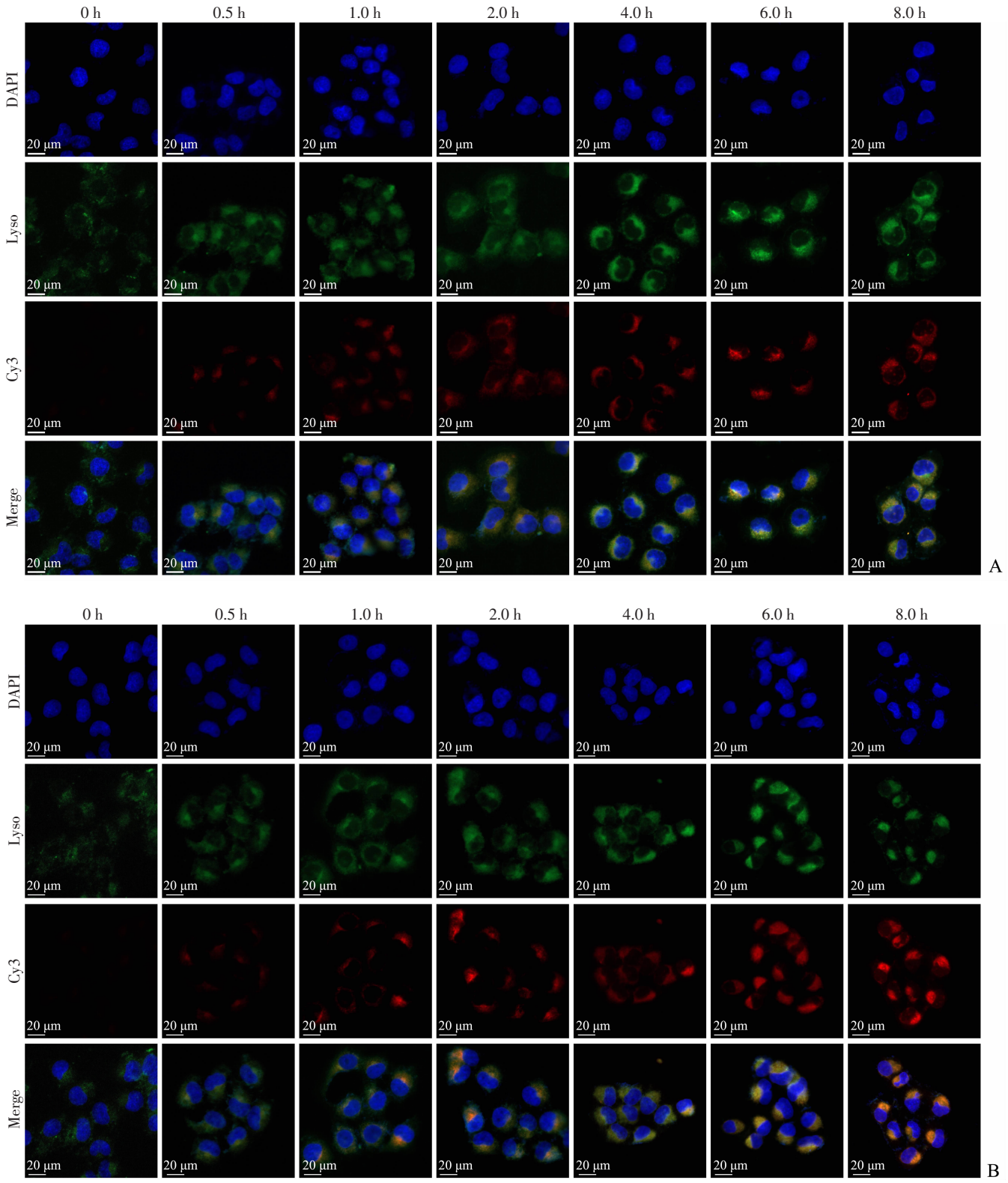
运用活性氧探针(DHE)检测细胞内氧化应激(ROS)水平,激光共聚焦显微镜和流式细胞仪检测结果均表明纳米药物能明显降低细胞 ROS 的产生量(图 4C、D),与 Model 组比较,PN NP 组 ROS 产生相对量降低 36.96%,而 pl-PN NP 组 ROS 产生相对量降低 49.42%。

2.4 纳米药物体外安全性评价

采用 CCK-8 检测两种纳米药物对 HTR8 细胞的毒性,结果显示:纳米药物浓度升高到 1 024 μg/mL 时不会对细胞活性产生影响(图 5A)。体外溶血实验也表明纳米药物含量增加到 1 mg/mL 时,未观察到溶血现象(图 5B~E)。两种体外实验均证明 PN NP 和 pl-PN NP 具有良好的生物安全性,可用于体内的实验研究。

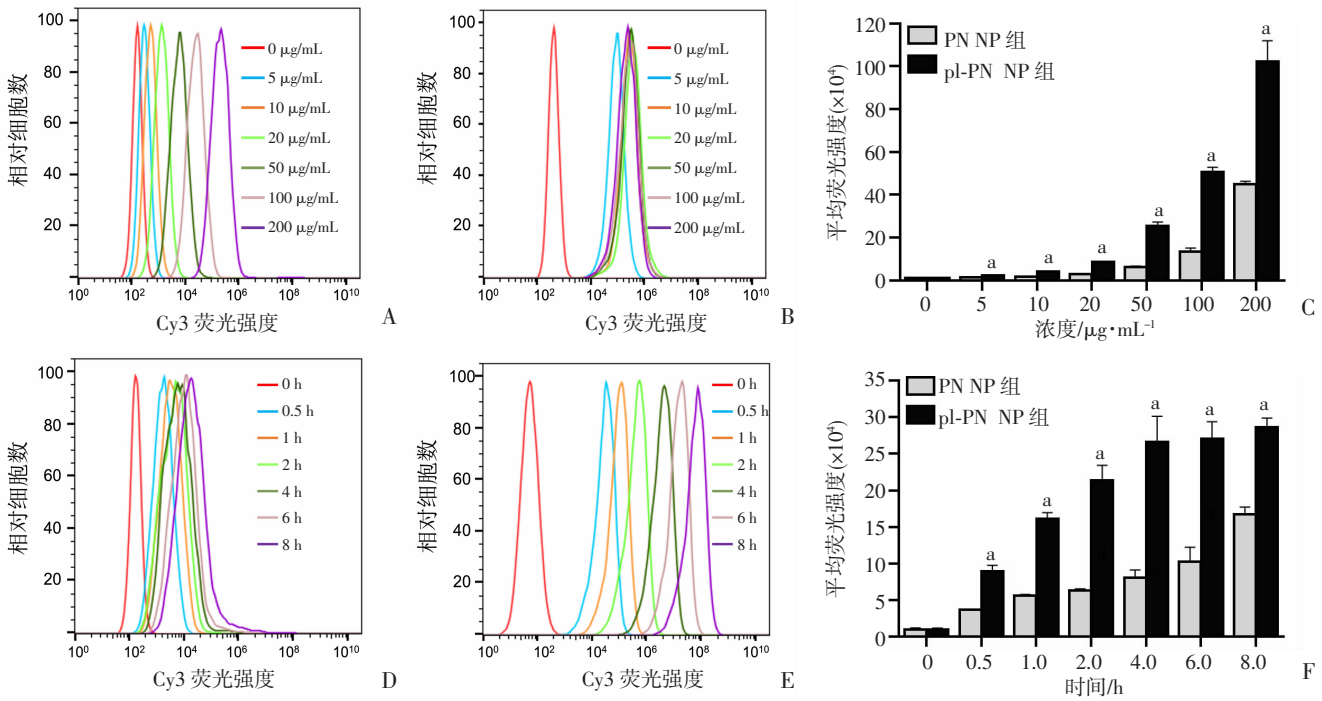
2.5 纳米药物胎盘靶向性研究

注射 Cy3 荧光标记纳米药物后,通过滋养层标志物细胞角蛋白(CK7)对胎盘靶向性进行考察,结果显示:Cy3 纳米药物主要和滋养层细胞共定位(图 6A),并且 Cy3-pl-PN NP 组荧光强度明显高于 Cy3-PN NP 组($P<0.05$,图 6B)。表明 plCSA-BP 可将药物递送至滋养层。



A:HTR8 细胞对 PN NP 吞噬的时间依赖性;B:HTR8 细胞对 pl-PN NP 吞噬的时间依赖性

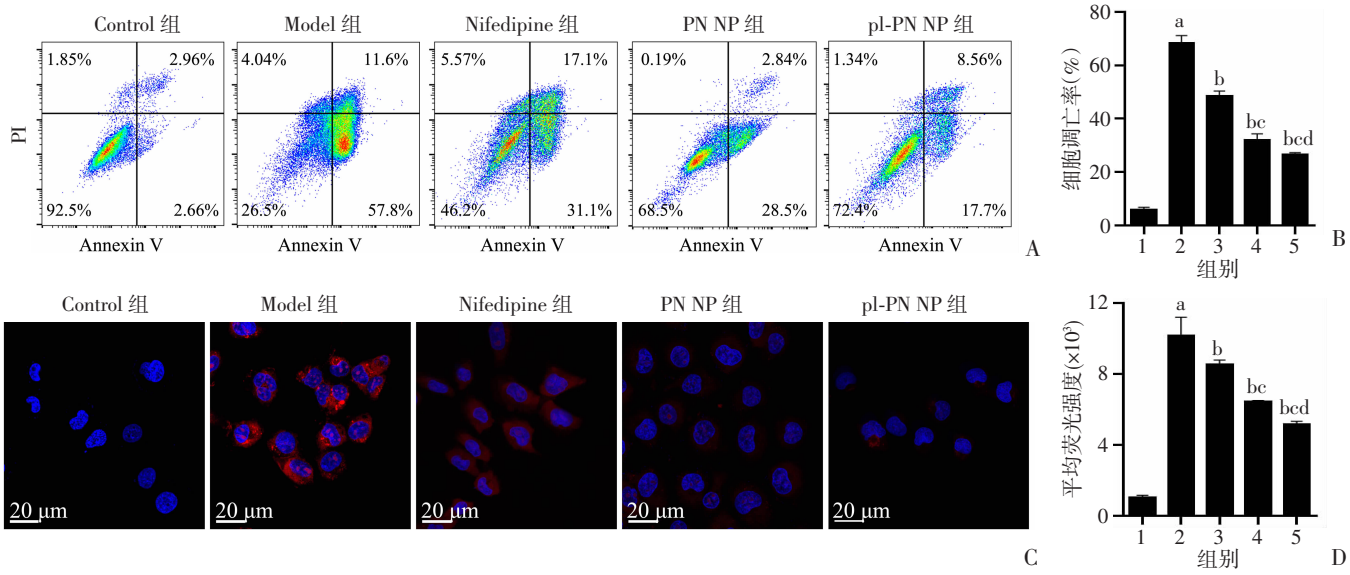
图 2 激光共聚焦显微镜观察 HTR8 细胞对 PN NP 和 pl-PN NP 吞噬的时间依赖性



a:$P<0.05$,与 PN NP 组比较

A:细胞对 PN NP 吞噬的浓度依赖性;B:细胞对 pl-PN NP 吞噬的浓度依赖性;C:细胞对两种纳米药物吞噬的浓度依赖性荧光强度比较;D:细胞对 PN NP 吞噬的时间依赖性;E:细胞对 pl-PN NP 吞噬的时间依赖性;F:细胞对两种纳米药物吞噬的时间依赖性荧光强度比较

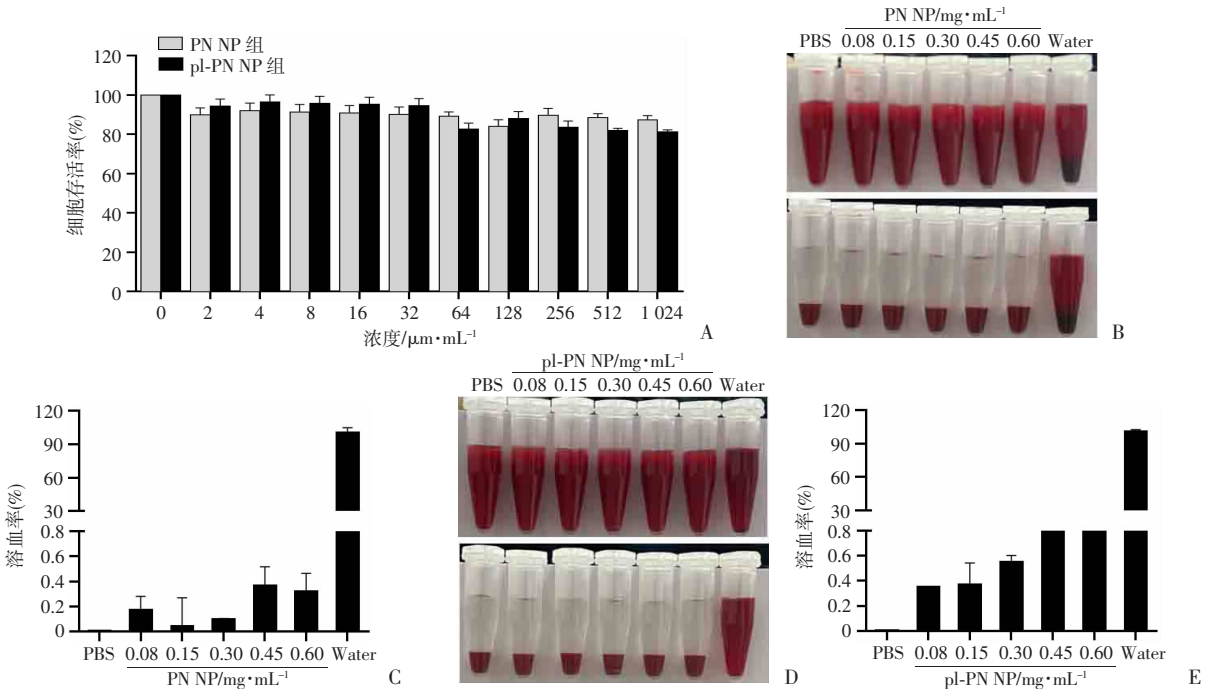
图 3 流式细胞仪检测 HTR8 细胞对 PN NP 和 pl-PN NP 吞噬的浓度和时间依赖性 ($n=3$)



1:Control 组;2:Model 组;3:Nifedipine 组;4:PN NP 组;5: pl-PN NP 组;a:$P<0.05$,与 Control 组比较;b:$P<0.05$,与 Model 组比较;c:$P<0.05$,与 Nifedipine 组比较;d:$P<0.05$,与 PN NP 组比较

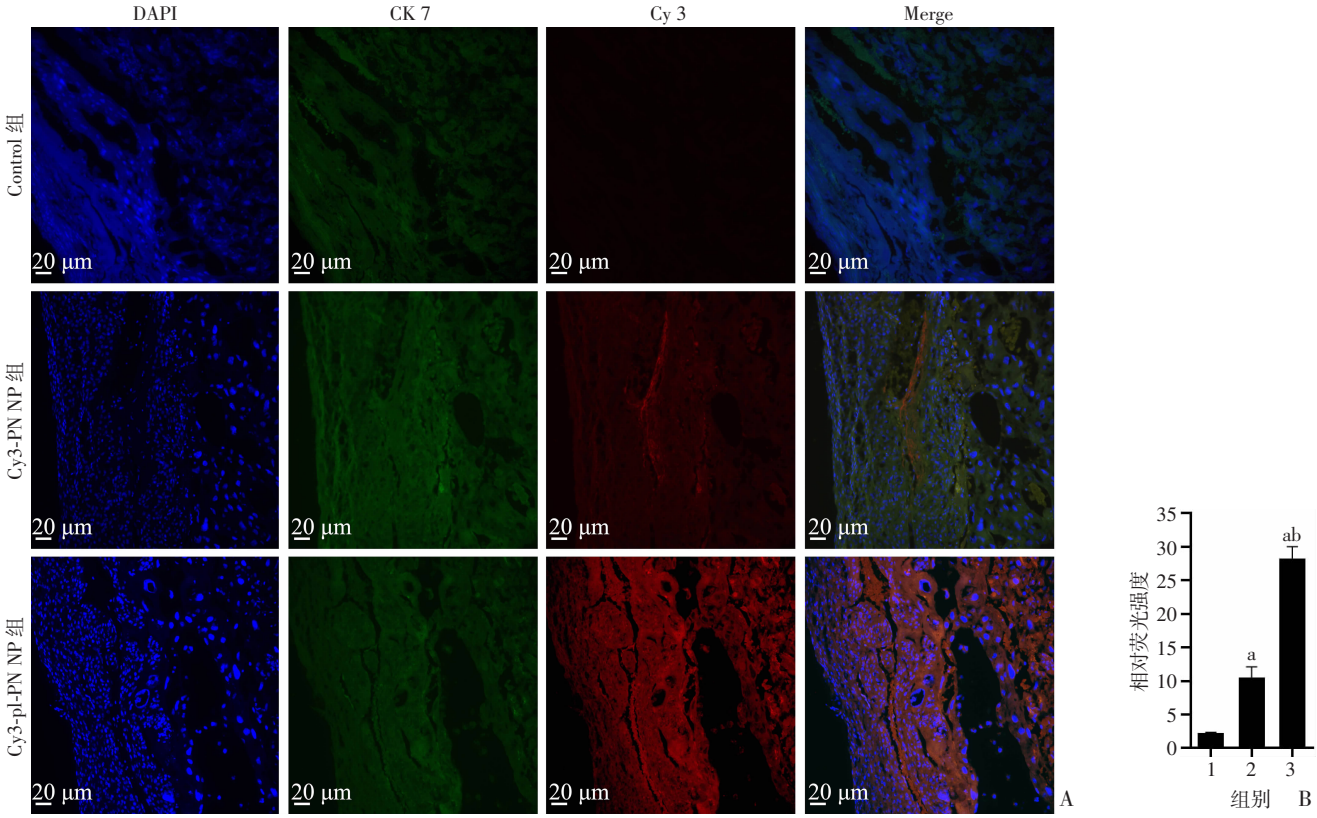
A、B:分别为流式细胞仪检测细胞凋亡及细胞凋亡率分析;C、D:分别为激光共聚焦显微镜观察细胞氧化应激水平及流式细胞仪检测结果分析

图 4 纳米药物抑制细胞凋亡和氧化应激水平 ($n=3$)



A:CCK-8 检测不同浓度纳米药物孵育 24 h 对细胞的毒性的影响;B:体外考察 PN NP 的溶血现象　上图为孵育前,下图为孵育及离心后;C:PN NP 孵育后对应的溶血率;D:体外考察 pl-PN NP 的溶血现象　上图为孵育前,下图为孵育及离心后;E:pl-PN NP 孵育后对应的溶血率

图 5　纳米药物体外安全性评价　(n=5)



A:荧光显微镜观察胎盘中纳米药物的胎盘靶向性; B:胎盘内 Cy3 平均强度荧光分析　1:Control 组;2:Cy3-PN NP 组;3:Cy3-pl-PN NP 组;a:P<0.05,与 Control 组比较;b:P<0.05,与 Cy3-PN NP 组比较

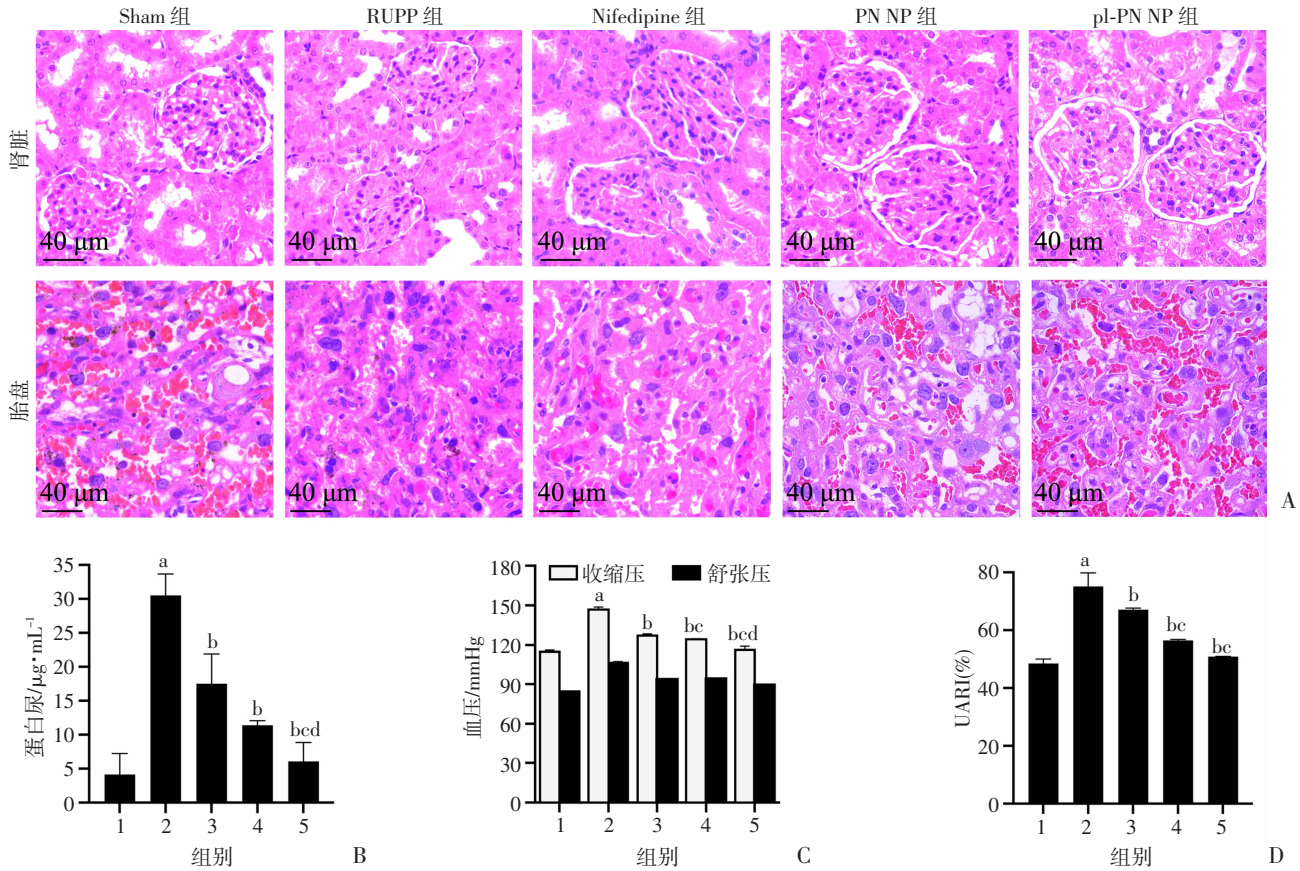
图 6　免疫荧光染色考察 PN NP 和 pl-PN NP 在体内对胎盘的靶向性　(n=6)

2.6　评价纳米药物对子痫前期大鼠模型的治疗效果

各组治疗后,与 Sham 组相比,RUPP 组血压明显上升($P<0.001$),并且升高的血压会造成肾脏受损(图 7A)、肾小球萎缩,进而出现蛋白尿($P<0.001$)。胎盘 HE 染色可见迷路层绒毛发育受阻,血管内皮损伤、梗死、血供减少,超声多普勒提示 UARI 升高($P<0.001$)。给予硝苯地平治疗后,与 RUPP 组相比,硝苯地平组血压下降($P<0.001$)、蛋白尿比重减少($P=0.038$)、UARI 降低($P=0.018$),但硝苯地平组与 Sham 组相比差异有统计学意义(BP:$P<0.001$,蛋白尿:$P=0.034$,UARI:$P<0.001$),肾脏和胎盘损伤依然存在(图 7A),PN NP 组和 pl-PN NP 组中血压、蛋白尿、UARI 明显下降,与 RUPP 组比较差异有统计学意义($P<0.05$),且治疗效果优于硝苯地平组(图 7B~D)。HE 染色结果也显示 PN NP 和 pl-PN NP 可在一定程度上改善肾小球的损伤和胎盘的血供情况。pl-PN NP 组血压下降比 PN NP 组更为明显($P<0.001$)。

2.7　纳米药物调控子痫前期大鼠模型胎盘中 TNF-α、IL-6、UCP-1、Nrf-2 的表达

考虑到氧化应激通过多种途径诱发子痫前期,而子痫前期本身也是母体对于妊娠的过度炎症反应,因此,本研究探讨炎症因子和氧化应激因子是否受纳米药物调控。如图 8 所示:与 Sham 相比,RUPP 组中细胞炎症因子 TNF-α、IL-6 表达明显上升,抗氧化应激因子 UCP-1、Nrf2 表达明显下降(P 均<0.001)。与 RUPP 组相比,硝苯地平组、PN NP 组和 pl-PN NP 组均能降低 TNF-α、IL-6,升高 UCP-1、Nrf2($P<0.05$),但 pl-PN NP 组效果比 PN NP 组更为显著(TNF-α:$P=0.090$,IL-6:$P<0.001$,UCP-1:$P=0.035$,Nrf2:$P=0.046$),证明了纳米药物的抗炎和抗氧化应激效果。



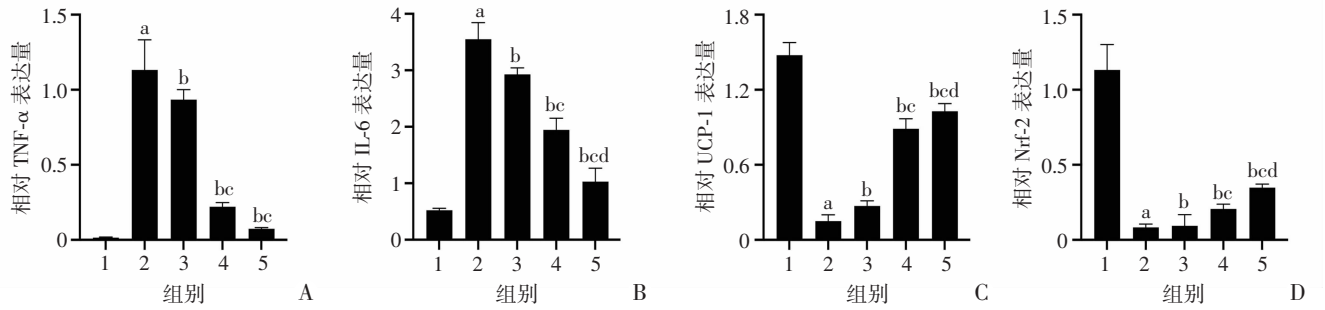
1:Sham 组;2:RUPP 组;3:Nifedipine 组;4: PN NP 组;5:pl-PN NP 组;a:$P<0.05$,与 Sham 组比较;b:$P<0.05$,与 RUPP 组比较;c:$P<0.05$,与 Nifedipine 组比较;d:$P<0.05$,与 PN NP 组比较

A:各组治疗后肾脏和胎盘 HE 染色;B:各组治疗后尿蛋白定量比较;C:各组治疗后血压测量值比较;D:各组治疗后 UARI 比较

图 7　体内考察纳米药物对子痫前期大鼠模型的治疗效果　($n=6$)

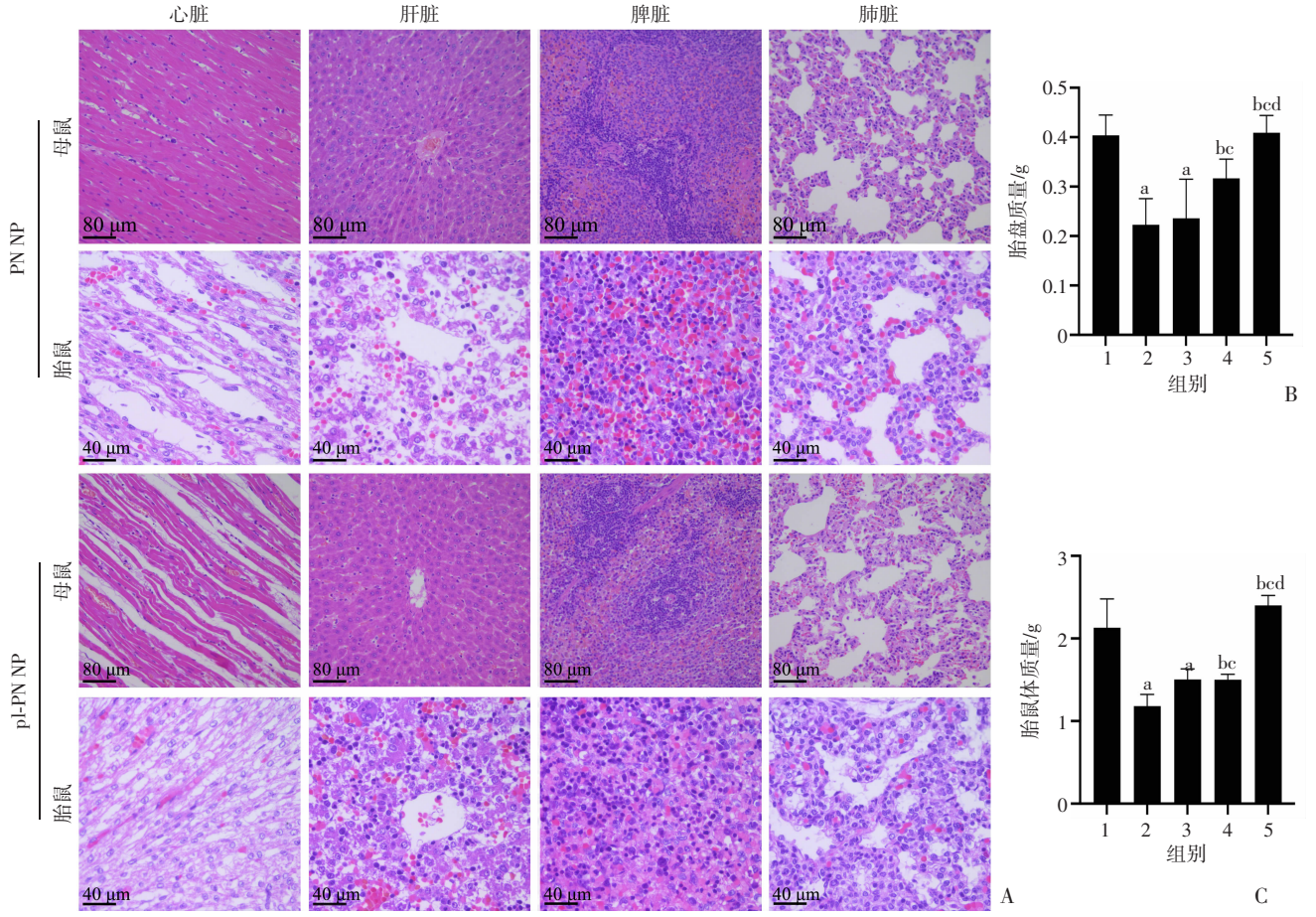
2.8 评价纳米药物对子痫前期大鼠模型妊娠结局的影响

剖宫产取 E20 母鼠子代,其中 RUPP 组孕 20 d 子代和胎盘体质量与假手术组相比差异有统计学意义(胎鼠:$P<0.001$,胎盘:$P=0.002$),硝苯地平治疗后胎鼠和胎盘质量与 RUPP 组相比差异无统计学意义(胎鼠:$P=0.066$;胎盘:$P=0.777$),PN NP 组和 pl-PN NP 组治疗后胎鼠和胎盘质量与 RUPP 组相比均增加($P<0.05$),且 pl-PN NP 组治疗后胎鼠和胎盘体质量增加比 PN NP 组更为显著(胎鼠:$P<0.001$,胎盘:$P=0.047$)。HE 染色观察母鼠和胎鼠分离的除肾脏之外的主要器官,结果显示:PN NP 组和 pl-PN NP 组未观察到炎症细胞的浸润和损伤(图 9),证明了两种纳米药物对于妊娠的安全性。



1:Sham 组;2:RUPP 组;3:Nifedipine 组;4:PN NP 组;5:pl-PN NP 组;a:$P<0.05$,与 Sham 组比较;b:$P<0.05$,与 RUPP 组比较;c:$P<0.05$,与 Nifedipine 组比较;d:$P<0.05$,与 PN NP 组比较

图 8 纳米药物调控子痫前期大鼠模型胎盘中 TNF-α(A)、IL-6(B)、UCP-1(C)、Nrf-2(D)的表达 ($n=6$)



1:Sham 组;2:RUPP 组;3:Nifedipine 组;4:PN NP 组;5:pl-PN NP 组;a:$P<0.05$,与 Sham 组比较;b:$P<0.05$,与 RUPP 组比较;c:$P<0.05$,与 Nifedipine 组比较;d:$P<0.05$,与 PN NP 组比较

A:纳米组治疗后母鼠和胎鼠主要脏器 HE 染色;B:各组治疗后胎盘质量比较;C:各组治疗后胎鼠体质量比较

图 9 纳米药物对子痫前期大鼠模型妊娠结局的影响 ($n=6$)

3 讨论

子痫前期的发病机制主要分为两个不同阶段[20]:第一阶段无症状,但可以观察到异常的胎盘结构和相关因子在母体循环的累积;第二阶段以胎盘氧化应激、高血压和蛋白尿为特征。临床上第一阶段的子痫前期很难被发现,所以大多数研究都针对第二阶段进行。硝苯地平作为钙通道阻滞剂,临床上常用来治疗高血压疾病,但对于硝苯地平治疗子痫前期,临床使用也存在局限性和争议[21],比如半衰期短,需要每日服用3次,短效硝苯地平在口服或舌下含服的状态下,降压速度太快,服药后半小时内明显降低平均动脉压,导致严重低血压、心肌梗死[22],也可非选择性扩张头部毛细血管引发头晕、头痛和面部潮红[23]。

纳米药物作为传递系统,具有很多优点,比如增加渗透性、体内循环时间和外渗能力,且广泛用于治疗癌症和其他疾病[24]。其中,纳米药物对不同器官的靶向能力对于治疗至关重要,而在关于妊娠相关的疾病研究中,分子性状、表面修饰和粒径决定了纳米是否能穿过胎盘屏障从而达到治疗母体、胎盘、胎儿疾病的目的[25]。尽管胎盘血流丰富,可以暴露于体内循环的药物,但也只有一小部分非靶向性的纳米药物能够达到胎盘部位。不仅如此,非靶向性纳米药物也将药物递送至其他器官,对其他器官产生一定程度的损害。因此,将纳米药物特异性地靶向胎盘组织对于开发纳米药物治疗妊娠相关疾病至关重要。其中,CSA 是一种存在于胎盘合体滋养细胞上的蛋白质[26]。已有研究证明 CSA 在人和鼠胎盘组织中的存在,合成的胎盘 CSA 结合肽可以特异性结合胎盘中的滋养层细胞,但不能特异性地结合其他组织中表达 CSA 的细胞。据报道称,plCSA-BP 纳米药物可以有效靶向胎盘[27]。基于此纳米系统,本研究合成了包裹硝苯地平的纳米药物(PN NP)和 plCSA-BP 纳米药物(pl-PN NP),并分析了其在体外和体内的功能。在人滋养层 HTR8-SVneo 细胞中,流式细胞仪和免疫荧光检测结果均证明 plCSA-BP 纳米药物显著性地增加累积能力。此外,体内靶向性实验也检测了 PN NP 和 pl-PN NP 纳米药物靶向妊娠 SD 大鼠胎盘的效率。表明具有 plCSA-BP 的纳米药物在大鼠胎盘中的蓄积能力显著增强。因此,将 plCSA-BP 结合在 PN NP 药物表面增强了其将药物靶向递送至胎盘的能力。

将 PN NP 和 pl-PN NP 注射到 RUPP 模型中,可以显著降低其血压、尿蛋白水平,改善其胎盘血流供应情况进而减轻炎症和氧化应激水平。滋养层靶向的 pl-PN NP 具有更强的治疗效果。不仅如此,在子痫前期大鼠模型治疗中两种纳米药物对胎鼠和母鼠安全性良好,不穿过胎盘屏障进入胎鼠,也没有任何胎鼠毒性。此外,两种纳米药物还在一定程度上改善了因胎盘血流受阻而造成的胎鼠发育受限。表明 PN NP 和 pl-PN NP 作为治疗子痫前期药物在大鼠体内是有效且安全的。

但是,为了使这种胎盘靶向纳米药物在临床上被采用和接受,需要进一步的研究和开发,优化纳米药物以提高包裹和释放药物的效率,深入研究该纳米药物治疗妊娠期疾病的安全性评价,以确保这种纳米药物的有效性和安全性。

参考文献:

[1] NORIS M, PERICO N, REMUZZI G. Mechanisms of disease: pre-eclampsia[J]. Nat Clin Pract Nephrol, 2005, 1(2): 98-114;quiz120. DOI: 10.1038/ncpneph0035.

[2] ABALOS E, CUESTA C, GROSSO A L, *et al*. Global and regional estimates of preeclampsia and eclampsia: a systematic review[J]. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol, 2013, 170(1): 1-7. DOI: 10.1016/j.ejogrb.2013.05.005.

[3] WALSH S W, STRAUSS J F 3rd. The road to low-dose aspirin therapy for the prevention of preeclampsia began with the placenta[J]. Int J Mol Sci, 2021, 22(13): 6985. DOI: 10.3390/ijms22136985.

[4] BONNET M P, GARNIER M, KEITA H, *et al*. Guidelines for the management of women with severe pre-eclampsia[J]. Anaesth Crit Care Pain Med, 2021, 40(5): 100901. DOI: 10.1016/j.accpm.2021.100901.

[5] TONG M, CHEN Q, JAMES J L, *et al*. Micro- and nanovesicles from first trimester human placentae carry Flt-1 and levels are increased in severe preeclampsia[J]. Front Endocrinol (Lausanne), 2017, 8: 174. DOI: 10.3389/fendo.2017.00174.

[6] BIRÓ O, FÓTHI Á, ALASZTICS B, *et al*. Circulating exosomal and argonaute-bound microRNAs in preeclampsia[J]. Gene, 2019, 692: 138-144. DOI: 10.1016/j.gene.2019.01.012.

[7] ZHANG B Z, CHENG G G, ZHENG M B, *et al*. Targeted delivery of doxorubicin by CSA-binding nanoparticles for choriocarcinoma treatment[J]. Drug Deliv, 2018, 25(1): 461-471. DOI: 10.1080/10717544.2018.1435750.

[8] NELSON K M, IRVIN-CHOY N, HOFFMAN M K, *et al*. Diseases and conditions that impact maternal and fetal health and the potential for nanomedicine therapies[J]. Adv Drug Deliv Rev, 2021, 170: 425-438. DOI: 10.1016/j.addr.2020.09.013.

[9] CHEN Q, GUO F, LIU S R, *et al*. Calcium channel blockers prevent endothelial cell activation in response to necrotic

trophoblast debris: possible relevance to pre-eclampsia[J]. Cardiovasc Res, 2012, 96(3): 484-493. DOI: 10.1093/cvr/cvs279.

[10] TOAL C B, MEREDITH P A, ELLIOTT H L. Long-acting dihydropyridine calcium-channel blockers and sympathetic nervous system activity in hypertension: a literature review comparing amlodipine and nifedipine GITS[J]. Blood Press, 2012, 21(Suppl 1): 3-10. DOI: 10.3109/08037051.2012.690615.

[11] BOLNICK A D, BOLNICK J M, KOHAN-GHADR H R, *et al*. Nifedipine prevents apoptosis of alcohol-exposed first-trimester trophoblast cells[J]. Alcohol Clin Exp Res, 2018, 42(1): 53-60. DOI: 10.1111/acer.13534.

[12] LV Z, XIONG L L, QIN X, *et al*. Role of GRK2 in trophoblast necroptosis and spiral artery remodeling: implications for preeclampsia pathogenesis[J]. Front Cell Dev Biol, 2021, 9: 694261. DOI: 10.3389/fcell.2021.694261.

[13] PARIA B C, REESE J, DAS S K, *et al*. Deciphering the cross-talk of implantation: advances and challenges[J]. Science, 2002, 296(5576): 2185-2188. DOI: 10.1126/science.1071601.

[14] LABARRERE C A, DICARLO H L, BAMMERLIN E, *et al*. Failure of physiologic transformation of spiral arteries, endothelial and trophoblast cell activation, and acute atherosis in the basal plate of the placenta[J]. Am J Obstet Gynecol, 2017, 216(3): 287.e1-287287.e16. DOI: 10.1016/j.ajog.2016.12.029.

[15] GADONSKI G, LAMARCA B B, SULLIVAN E, *et al*. Hypertension produced by reductions in uterine perfusion in the pregnant rat: role of interleukin 6[J]. Hypertension, 2006, 48(4): 711-716. DOI: 10.1161/01.HYP.0000238442.33463.94.

[16] MURAKAMI Y, KOBAYASHI T, OMATSU K, *et al*. Exogenous vascular endothelial growth factor can induce pre-eclampsia-like symptoms in pregnant mice[J]. Semin Thromb Hemost, 2005, 31(3): 307-313. DOI: 10.1055/s-2005-872437.

[17] WOODS A K, HOFFMANN D S, WEYDERT C J, *et al*. Adenoviral delivery of VEGF121 early in pregnancy prevents spontaneous development of preeclampsia in BPH/5 mice[J]. Hypertension, 2011, 57(1): 94-102. DOI: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.110.160242.

[18] MURPHY S R, COCKRELL K. Regulation of soluble fms-like tyrosine kinase-1 production in response to placental ischemia/hypoxia: role of angiotensin II[J]. Physiol Rep, 2015, 3(2): e12310. DOI: 10.14814/phy2.12310.

[19] LI J, LAMARCA B, RECKELHOFF J F. A model of pre-eclampsia in rats: the reduced uterine perfusion pressure (RUPP) model[J]. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2012, 303(1): H1-H8. DOI: 10.1152/ajpheart.00117.2012.

[20] GRANGER J P, ALEXANDER B T, LLINAS M T, *et al*. Pathophysiology of preeclampsia: linking placental ischemia/hypoxia with microvascular dysfunction[J]. Microcirculation, 2002, 9(3): 147-160. DOI: 10.1038/sj.mn.7800137.

[21] Committee on obstetric practice. Committee opinion no. 692: emergent therapy for acute-onset, severe hypertension during pregnancy and the postpartum period[J]. Obstet Gynecol, 2017, 129(4): e90-e95. DOI: 10.1097/AOG.0000000000002019.

[22] KIRIYAMA A, HONBO A, NISHIMURA A, *et al*. Pharmacokinetic-pharmacodynamic analyses of antihypertensive drugs, nifedipine and propranolol, in spontaneously hypertensive rats to investigate characteristics of effect and side effects[J]. Regul Toxicol Pharmacol, 2016, 76: 21-29. DOI: 10.1016/j.yrtph.2016.01.003.

[23] WEBSTER L M, MYERS J E, NELSON-PIERCY C, *et al*. Labetalol versus nifedipine as antihypertensive treatment for chronic hypertension in pregnancy: a randomized controlled trial[J]. Hypertension, 2017, 70(5): 915-922. DOI: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.117.09972.

[24] CHANG E H, HARFORD J B, EATON M A, *et al*. Nanomedicine: Past, present and future: A global perspective[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2015, 468(3): 511-517. DOI: 10.1016/j.bbrc.2015.10.136.

[25] PRITCHARD N, KAITU´U-LINO T, HARRIS L, *et al*. Nanoparticles in pregnancy: the next frontier in reproductive therapeutics[J]. Hum Reprod Update, 2021, 27(2): 280-304. DOI: 10.1093/humupd/dmaa049.

[26] SALANTI A, DAHLBÄCK M, TURNER L, *et al*. Evidence for the involvement of VAR2CSA in pregnancy-associated malaria[J]. J Exp Med, 2004, 200(9): 1197-1203. DOI: 10.1084/jem.20041579.

[27] ZHANG B Z, TAN L B, YU Y, *et al*. Placenta-specific drug delivery by trophoblast-targeted nanoparticles in mice[J]. Theranostics, 2018, 8(10): 2765-2781. DOI: 10.7150/thno.22904.

(收稿:2022-01-19;修回:2022-02-24)

(编辑 张 维)