

血小板膜仿生纳米靶向探针的制备及体外寻靶实验研究

周佳 余才贵 姜楠 郭瑞强 曹省

摘要 目的 制备血小板膜仿生纳米靶向探针(PLT-RAP@NPs),探讨其在体外的免疫逃逸、靶向和黏附能力,以及联合超声靶向微泡释放技术(UTMD)后的载药释放情况。**方法** 采用单乳化-溶剂挥发法合成纳米探针RAP@NPs,梯度离心-反复冻融法提取血小板膜囊泡,超声震荡法制备PLT-RAP@NPs,检测其粒径、表面电位及稳定性,观察其微观形态,计算其包封率和载药率,确定雷帕霉素(RAP)负载的最佳方案。DiI荧光染料分别标记聚乳酸-羟基乙酸共聚物(PLGA, DiI@PLGA组)和PLT@PLGA(PLT-DiI@PLGA组),用于模拟RAP@NPs、PLT-RAP@NPs进行体外寻靶实验的荧光强度检测;将其分别与巨噬细胞、泡沫细胞和内皮细胞共孵育2 h,观察DiI@PLGA组与PLT-DiI@PLGA组橙红色荧光强度,分析各细胞对DiI@PLGA和PLT-DiI@PLGA的吞噬、摄取和黏附能力。细胞增殖-毒性实验观察不同浓度RAP(3.00 $\mu\text{g/ml}$ 、6.25 $\mu\text{g/ml}$ 、12.50 $\mu\text{g/ml}$ 、25.00 $\mu\text{g/ml}$ 、50.00 $\mu\text{g/ml}$ 、100.00 $\mu\text{g/ml}$)的游离RAP、RAP@NPs和PLT-RAP@NPs对细胞增殖活性的影响。体外药物控释实验观察PLT-RAP@NPs联合UTMD后载药释放效果。**结果** 本实验制备的PLT-RAP@NPs呈球形,大小均匀,表面覆盖薄膜,“核-壳”结构清晰,平均粒径(286.83 ± 5.25)nm,平均表面电位(-15.60 ± 5.04)mV。当100 mg PLGA负载3 mg RAP时,包封率为60.35%,载药率为2.18%。体外寻靶实验结果显示,巨噬细胞与纳米靶向探针共孵育2 h后,DiI@PLGA组橙红色荧光强度约为PLT-DiI@PLGA组3倍;泡沫细胞与靶向纳米探针共孵育2 h后,PLT-DiI@PLGA组橙红色荧光强度约为DiI@PLGA组4倍;内皮细胞与纳米靶向探针共孵育2 h后,PLT-DiI@PLGA组橙红色荧光强度较DiI@PLGA组增强。细胞增殖-毒性实验结果显示,随着RAP浓度增高,游离RAP中细胞增殖活性下降,而RAP@NPs和PLT-RAP@NPs中细胞增殖活性变化较小。体外药物控释实验结果显示,RAP@NPs和PLT-RAP@NPs中RAP均缓慢释放,72 h积累药物释放量分别为42.12%和33.74%,联合UTMD后积累药物释放量分别提升至75.57%和67.54%。**结论** 成功制备PLT-RAP@NPs,其可抑制巨噬细胞吞噬、增强泡沫细胞摄取和提高内皮细胞黏附,从而实现免疫逃逸及靶向能力,联合UTMD可进行RAP靶向控释。

关键词 血小板膜仿生纳米靶向探针;雷帕霉素;超声靶向微泡释放技术;动脉粥样硬化
[中图分类号]R445.1 [文献标识码]A

Preparation and in vitro targeting experiment of platelet membrane biomimetic targeting nanoprobes

ZHOU Jia, YU Caigui, JIANG Nan, GUO Ruiqiang, CAO Sheng

Department of Ultrasound Imaging, Renmin Hospital of Wuhan University, Hubei Key Laboratory of Cardiology, Cardiovascular Research Institute of Wuhan University, Wuhan 430060, China

ABSTRACT Objective To prepare platelet membrane biomimetic targeting nanoprobes (PLT-RAP@NPs), and to explore its immune escape, targeting and adhesion ability in vitro, as well as drug delivery after combined with ultrasound-targeted microbubble destruction (UTMD). **Methods** A nanoprobes RAP@NPs were synthesized by single emulsification-solvent evaporation technique. Platelet membrane vesicles extracted by density-gradient centrifugation and repeated freeze-thaw cycles. PLT-RAP@NPs were prepared by ultrasonic oscillation method. The particle size, surface potential and stability were detected, the microscopic morphology was observed, the encapsulation efficiency and drug loading efficiency of nanoprobes were calculated to determine the best drug-loading protocol for rapamycin (RAP). DiI dye was encapsulated into PLGA and PLT@PLGA to form DiI@PLGA group and PLT-DiI@PLGA group instead of the RAP@NPs and PLT-RAP@NPs, which were used to simulate RAP@NPs and PLT-RAP@NPs for fluorescence detection in in vitro targeting experiments. They were co-incubated with

基金项目:国家自然科学基金项目(81901757、82102045)

作者单位:430060 武汉市,武汉大学人民医院超声影像科 心血管病湖北省重点实验室 武汉大学心血管病研究所

通讯作者:曹省, Email: caosheng209@126.com

macrophages, foam cells and endothelial cells, endothelial cells for 2 h in vitro, respectively. The orange-red fluorescence intensity of DiI@PLGA group and PLT-DiI@PLGA group were observed. The phagocytosis, uptake and adhesion ability of these cells to the DiI@PLGA and PLT-DiI@PLGA were observed and analyzed. For evaluating cell proliferation and cytotoxicity, the cell viability at different concentration of RAP (3.00 $\mu\text{g/ml}$, 6.25 $\mu\text{g/ml}$, 12.50 $\mu\text{g/ml}$, 25.00 $\mu\text{g/ml}$, 50.00 $\mu\text{g/ml}$, 100.00 $\mu\text{g/ml}$) in free RAP, RAP@NPs and PLT-RAP@NPs were observed. The drug release of PLT-RAP@NPs combined with UTMD in vitro were evaluated. **Results** PLT-RAP@NPs were spherical, and showed a uniform size and clear core-shell structure. The surface of the shell was coated with a film. The particle size and surface potential were (286.83 \pm 5.25) nm and -(15.60 \pm 5.04) mV, respectively. When 100 mg PLGA was loaded with 3 mg RAP, the encapsulation efficiency and drug loading efficiency were 60.35% and 2.18%, respectively. The results of in vitro targeting experiment showed that after macrophages were co-incubated with DiI@PLGA and PLT-DiI@PLGA for 2 h, the orange-red fluorescence intensity of the DiI@PLGA group was approximately 3 times higher than that of the PLT-DiI@PLGA group, while the opposite result was obtained when the foam cells were co-incubated with the NPs. The orange-red fluorescence intensity of the PLT-DiI@PLGA group was approximately 4 times higher than that of the DiI@PLGA group. And the orange-red fluorescence intensity of the PLT-DiI@PLGA group was enhanced compared with DiI@PLGA group after endothelial cells co-incubated with the NPs. With the increase of the concentration of RAP, the cell viability of the free RAP gradually decreased, while the cell proliferation was less affected in RAP@NPs and PLT-RAP@NPs. Slow release of RAP from RAP@NPs and PLT-RAP@NPs were shown, the release percentage were 42.12% and 33.74% at 72 h, and were raised to 75.57% and 67.54% after combined with UTMD, respectively. **Conclusion** The successfully prepared PLT-RAP@NPs can inhibit macrophage phagocytosis, enhance foam cell uptake and improve endothelial cell adhesion, so as to achieve immune escape and targeting ability. Combined with UTMD, RAP targeted controlled release can be realized.

KEY WORDS Platelet membrane biomimetic targeting nanoprobes; Rapamycin; Ultrasound-targeted microbubble destruction; Atherosclerosis

动脉粥样硬化 (atherosclerosis, AS) 及其相关不良心血管事件的防治是一项重大的临床挑战。由于 AS 病理生理机制复杂, 采用单一药物治疗往往效果不佳, 联合治疗方式逐渐成为研究热点。免疫抑制剂雷帕霉素 (rapamycin, RAP) 具有独特的抗 AS 作用, 局部靶向给药可有效避免传统给药方式带来的全身不良反应。包覆血小板膜的纳米探针因其独特的靶向能力已成为靶向给药的重要载体之一, 超声靶向微泡释放技术 (ultrasound-targeted microbubble destruction, UTMD) 是一种安全有效的物理靶向方法, 其在靶向递药、基因转染及溶栓治疗等方面均有广阔的应用前景。本实验通过将 RAP 的药理作用、纳米探针的增容作用、血小板膜的生物学作用和 UTMD 的物理效应相结合, 制备血小板膜仿生纳米靶向探针 (platelet membrane biomimetic targeting nanoprobes, PLT-RAP@NPs), 并评价其在体外的免疫逃逸、靶向和黏附能力, 以及联合 UTMD 后的载药控释情况, 旨在探索一种治疗 AS 的新策略。

材料与方法

一、实验材料

1. 主要试剂: 聚乙烯醇、聚乳酸-羟基乙酸共聚物 (PLGA, 聚合比例 50:50, 分子量 13 000, 美国 Sigma-Aldrich 公司); 二氯甲烷 (上海阿拉丁生化科技股份公

司); PBS 缓冲液、乙腈 (美国 ThermoFisher Scientific 公司); RAP (大连美仑生物技术有限公司); RAW 264.7 巨噬细胞、血管平滑肌细胞和人脐静脉内皮细胞 (美国 ATCC 公司); 氧化型低密度脂蛋白 (广州奕源生物科技有限公司); DAPI、DiI 和 CCK-8 溶液 (上海碧云天公司); 注射用六氟化硫微泡 (SonoVue, 意大利 Bracco 公司)。

2. 主要仪器: 超声波细胞破碎仪 (VCX150, 美国 Sonics & Materials 公司); 高速冷冻离心机 (5804/R, 德国 Eppendorf 公司); 离心机 (湖南力辰仪器公司); 超声浴波仪 (FS30D) 和荧光显微镜 (EVOS M5000) 均由美国 ThermoFisher Scientific 公司提供; 纳米粒度电位仪 (Zetasizer Nano ZS, 英国 Malvern 公司); 透射电子显微镜 (Tecnai G2 F20 S-TWIN, 美国 FEI 公司); 电动恒温磁力搅拌仪 (常州国华电器公司); 超声空化仪 (WED-100, 深圳威尔德医疗公司); 多功能酶标仪 (TECAN M1000, 瑞士 TECAN 公司)。

二、实验方法

1. PLT-RAP@NPs 的制备

(1) 单乳化-溶剂挥发法合成纳米探针 RAP@NPs: 将 100 mg PLGA 加入 3 ml 二氯甲烷中, 完全溶解成有机相后再加入 RAP; 将 5 g 聚乙烯醇加入 100 ml 纯水得到 5% 聚乙烯醇溶液为外水相, 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存; 冰浴下将有机相缓慢加入 15 ml 外水相中, 超声波乳

化90 s(能量60%,工作5 s,间隔5 s);将上述乳液用电动恒温磁力搅拌仪搅拌2~5 h充分挥发有机溶剂,高速冷冻离心机离心10 min(4℃、10 000 r/min),弃上清液,沉淀即得到RAP@NPs。

(2)梯度离心-反复冻融法提取血小板膜囊泡:取小鼠静脉血离心5 min(室温、300 r/min),去沉淀分离红细胞与白细胞;然后将上清液再次离心5 min(室温、300 r/min)去沉淀,得到含血小板的血浆;将上清液离心4 min(室温、2000 r/min),沉淀物即为血小板;将蛋白酶抑制剂溶于PBS缓冲液(比例1:100),加入乙二胺四乙酸,使其浓度为1 mmol/L;将分离的血小板用PBS缓冲液重悬,-80℃冷冻。室温下重复冷冻、解冻3次;PBS缓冲液洗涤,高速冷冻离心机离心5 min(4℃、21 000 r/min),重复3次,超声浴波仪振荡5 min,即得到血小板膜囊泡,-80℃保存。

(3)超声震荡法制备PLT-RAP@NPs:取RAP@NPs用PBS缓冲液重悬,加入过量血小板膜囊泡后应用超声浴波仪振荡5 min;高速冷冻离心机离心10 min(4℃、12 000 r/min),去上清液后沉淀即得到PLT-RAP@NPs,4℃保存。

2. PLT-RAP@NPs的表征测定

将制备好的RAP@NPs、PLT-RAP@NPs分别用PBS缓冲液重悬,观察其外观,使用纳米粒度电位仪检测RAP@NPs、PLT-RAP@NPs粒径和表面电位,均重复3次取平均值。应用透射电子显微镜观察其微观形态,然后分别置入10%胎牛血清和PBS缓冲液中,37℃恒温培养箱孵育,连续1周取纳米溶液使用纳米粒度电位仪检测粒径和表面电位,观察其稳定性。

3. PLT-RAP@NPs中RAP的包封率和载药率计算

取适量RAP用乙腈溶解,稀释成浓度分别为(1 μg/ml、2 μg/ml、10 μg/ml、20 μg/ml、100 μg/ml、200 μg/ml、500 μg/ml、1000 μg/ml)的标准溶液,采用高效液相色谱法建立标准曲线。再将3 mg、5 mg、10 mg RAP分别加入100 mg PLGA及血小板膜囊泡制备PLT-RAP@NPs,将其溶于1 ml乙腈,离心取上清液复溶后10 μl上样分析,根据标准曲线获得包载的RAP重量,计算包封率和载药率。

4. PLT-RAP@NPs的体外寻靶实验

(1)细胞培养和泡沫细胞制备:RAW 264.7巨噬细胞培养采用含10%胎牛血清的RPMI 1640培养基;人脐静脉内皮细胞培养采用含100 U/ml链霉素和0.01%青霉素的EBM-2内皮生成培养基,于37℃、5%CO₂细胞培养箱中培养。泡沫细胞的制备:待RAW 264.7巨噬细胞生长密度为50%时,使用浓度为50 μg/ml的氧

化型低密度脂蛋白处理24 h,进行泡沫化后应用油红O脂肪染色鉴定巨噬细胞是否成功转化为泡沫细胞。泡沫细胞制备成功的标准为油红O染色显示细胞体积增大,呈圆形、短梭形或不规则形,胞浆内可见大量红色或暗红色圆形脂滴。

(2)荧光标记的纳米探针DiI@PLGA、PLT-DiI@PLGA的制备:方法同RAP@NPs和PLT-RAP@NPs制备,将其中RAP更换成0.1 wt% DiI荧光染料,即可制备荧光标记的纳米探针DiI@PLGA和PLT-DiI@PLGA,用于模拟RAP@NPs和PLT-RAP@NPs进行体外寻靶实验的荧光检测。

(3)体外巨噬细胞吞噬实验:将RAW 264.7巨噬细胞接种于12孔板中,在37℃、5%CO₂细胞培养箱中孵育24 h;向培养板中分别加入DiI@PLGA(DiI@PLGA组)和PLT-DiI@PLGA(PLT-DiI@PLGA组),每组3个复孔,孵育2 h后PBS缓冲液洗涤;然后多聚甲醛固定30 min, PBS缓冲液洗涤3次;DAPI溶液染色10 min后,吸去多余DAPI, PBS缓冲液洗涤3次;使用荧光显微镜观察两组细胞荧光强度。

(4)体外泡沫细胞摄取实验:于制备成功的泡沫细胞中分别加入DiI@PLGA(DiI@PLGA组)和PLT-DiI@PLGA(PLT-DiI@PLGA组);其余步骤同体外巨噬细胞吞噬实验。

(5)体外内皮细胞黏附实验:先将人脐静脉内皮细胞均匀铺于12孔板中,在37℃、5%CO₂细胞培养箱中孵育24 h贴壁;当细胞浓度为80%~90%时,用100 ng/ml肿瘤坏死因子-α刺激2 h,上调血管性假血友病因子(vWF)表达,再分别加入PBS缓冲液(PBS组)、DiI@PLGA(DiI@PLGA组)、PLT-DiI@PLGA(PLT-DiI@PLGA组);其余步骤同体外巨噬细胞吞噬实验。

5. 细胞增殖-毒性实验

采用CCK8法进行细胞增殖-毒性实验。将RAW 264.7巨噬细胞和血管平滑肌细胞分别接种于96孔板中孵育24 h,于游离RAP、RAP@NPs和PLT-RAP@NPs中加入10 μl不同浓度RAP(3.00 μg/ml、6.25 μg/ml、12.50 μg/ml、25.00 μg/ml、50.00 μg/ml、100.00 μg/ml),每一浓度设置3个复孔,以PBS缓冲液为参照,再孵育48 h。加入10 μl CCK-8溶液,孵育2~4 h后应用多功能酶标仪检测450 nm处吸光度,细胞与RAP混合测得的吸光度记为OD_t,细胞与PBS缓冲液混合测得的吸光度记为OD_c,仅PBS缓冲液测得的吸光度记为OD_b,计算细胞增殖活性,公式为:细胞增殖活性=(OD_t-OD_b)/(OD_c-OD_b)×100%。

6. PLT-RAP@NPs联合UTMD的体外药物控释实验

采用体外透析法和高效液相色谱法观察 PLT-RAP@NPs 包载药物 RAP 的控释情况。按以下分组进行实验: RAP@NPs 组 (10 mg/ml、1.0 ml)、PLT-RAP@NPs 组 (10 mg/ml、1.0 ml)、RAP@NPs+SonoVue+UTMD 组 (其中 RAP@NPs 20 mg/ml、0.5 ml, SonoVue 0.5 ml)、PLT-RAP@NPs+SonoVue+UTMD 组 (其中 PLT-RAP@NPs 20 mg/ml、0.5 ml, SonoVue 0.5 ml)。将上述各组溶液分别装入透析袋中,用含 20 ml PBS 缓冲液的玻璃瓶密封,置于摇床中以 37℃、100 r/min 的速度摇晃,后两组取样前应用超声空化仪 (频率 1 MHz, 声强 2 W/cm², 占空比 40%) 辐照 30 s, 分别于 5 min、10 min、20 min、30 min、1 h、2 h、4 h、6 h、8 h、12 h、24 h、48 h、72 h 取出 0.5 ml 释放溶液,同时补充相同体积的 PBS 缓冲液。释放溶液中的 RAP 浓度采用高效液相色谱法定量测定,计算各组累积药物释放量,并绘制曲线图。

三、统计学处理

应用 SPSS 26.0 统计软件,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组比较采用单因素方差分析,两组比较采用独立样本 *t* 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

一、RAP@NPs 及 PLT-RAP@NPs 的表征

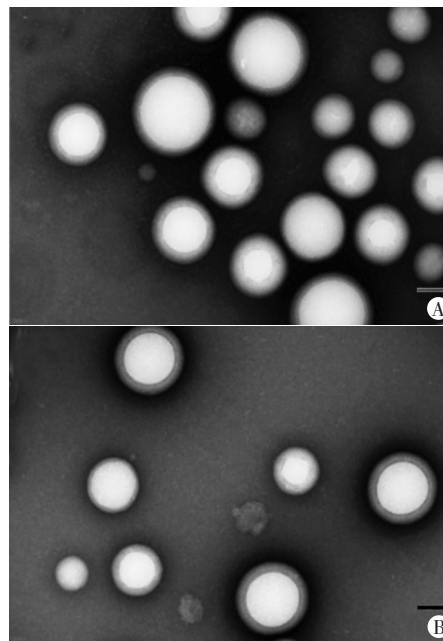
透射电子显微镜下 RAP@NPs 呈圆形,均匀分布 (图 1A),平均粒径 (256.47±5.41) nm,平均表面电位 -(18.57±0.84) mV; PLT-RAP@NPs 呈球形,大小均匀,表面覆盖一层薄膜、“核-壳”结构清晰 (图 1B),平均粒径 (286.83±5.25) nm,平均表面电位 -(15.60±5.04) mV。在 10% 胎牛血清和 PBS 缓冲液中分别储存 1 周后, RAP@NPs 的平均粒径和平均表面电位分别为 (247.52±7.21) nm、(250.36±6.95) nm 和 -(17.36±2.19) mV、-(17.28±1.64) mV, PLT-RAP@NPs 的平均粒径和平均表面电位分别为 (278.45±8.29) nm、(288.17±9.35) nm 和 -(14.28±3.94) mV、-(14.07±4.52) mV,其粒径和表面电位相对稳定,变化均小于 10%。

二、PLT-RAP@NPs 中 RAP 的包封率和载药率

由 3 mg、5 mg、10 mg RAP 制备成的 PLT-RAP@NPs 包封率分别为 60.35%、45.92%、41.03%,载药率分别为 2.18%、2.68%、2.97%。

三、PLT-RAP@NPs 的体外寻靶实验

体外寻靶实验结果显示,巨噬细胞吞噬实验中 DiI@PLGA 组橙红色荧光强度约为 PLT-DiI@PLGA 组 3 倍 (图 2A); 泡沫细胞摄取实验中 PLT-DiI@PLGA 组橙红色荧光强度约为 DiI@PLGA 组 4 倍 (图 2B); 内皮



A: RAP@NPs; B: PLT-RAP@NPs

图 1 RAP@NPs 和 PLT-RAP@NPs 透射电子显微镜下观 (标尺为 100 nm) 细胞黏附实验中 PLT-DiI@PLGA 组橙红色荧光强度较 DiI@PLGA 组增强 (图 3)。

四、细胞增殖-毒性实验

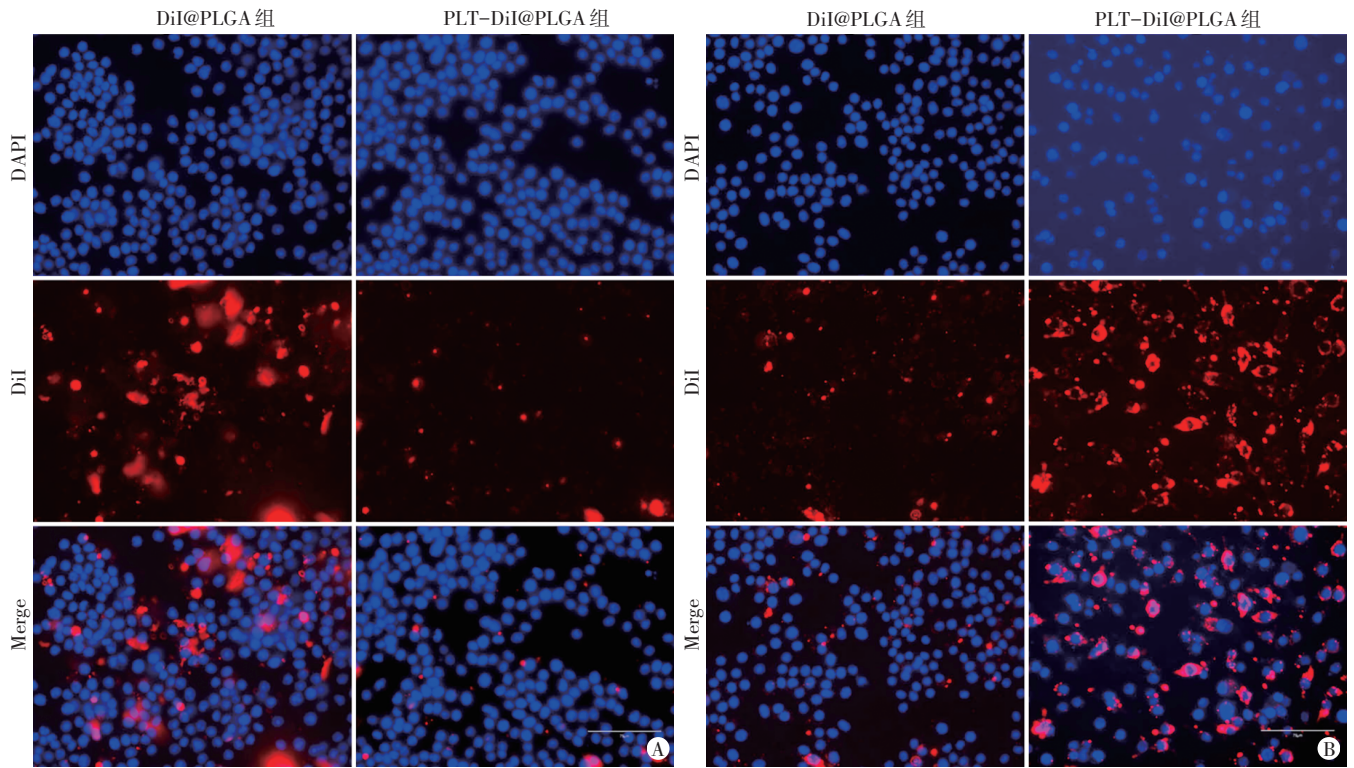
细胞增殖-毒性实验结果显示,随着 RAP 浓度增高,游离 RAP 中细胞增殖活性呈阶梯式下降;而 RAP@NPs 和 PLT-RAP@NPs 中细胞增殖活性变化较小。见图 4。

五、PLT-RAP@NPs 联合 UTMD 的体外药物控释实验

体外药物控释实验结果显示,各组纳米靶向探针中的 RAP 均缓慢释放,72 h 后 RAP@NPs 组和 PLT-RAP@NPs 组累积药物释放量分别为 42.12% 和 33.74%,联合 UTMD 后累积药物释放量分别提升至 75.57% 和 67.54%。见图 5。

讨 论

心血管疾病是累及人类健康的重要问题之一,其导致的高致残率和高死亡率造成了巨大的社会经济负担。AS 是心血管疾病的主要病理学因素,其是一种进行性、多因素、慢性炎症性疾病^[1]。由于 AS 病理生理机制复杂,目前临床对 AS 及相关不良心血管事件的防治仍是一项重大挑战,需不断促使临床医学、基础医学、医学影像学和纳米材料学交叉融合,探索新的治疗策略,以实现精准治疗^[2]。研究^[3]发现免疫抑制剂 RAP 可通过介导抗感染、抗增殖、免疫调节和脂质调节等信号通路对 AS 产生多重效性,从而改善斑块成



A:巨噬细胞吞噬实验;B:泡沫细胞摄取实验

图2 PLT-RAP@NPs体外寻靶实验荧光显微镜下观(标尺为75 μm)

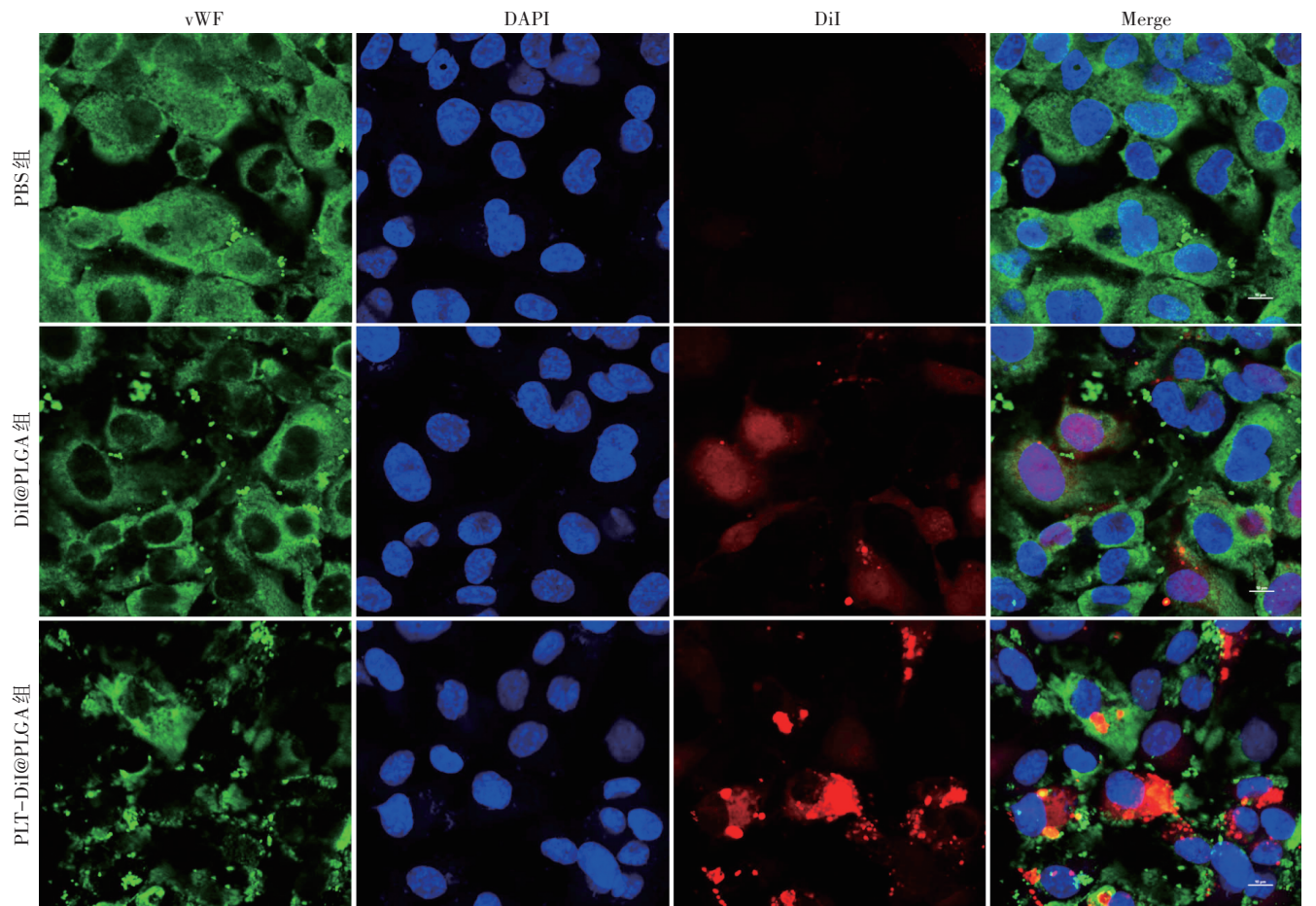


图3 人脐静脉内皮细胞黏附PLT-RAP@NPs体外寻靶实验荧光显微镜下观(标尺为10 μm)

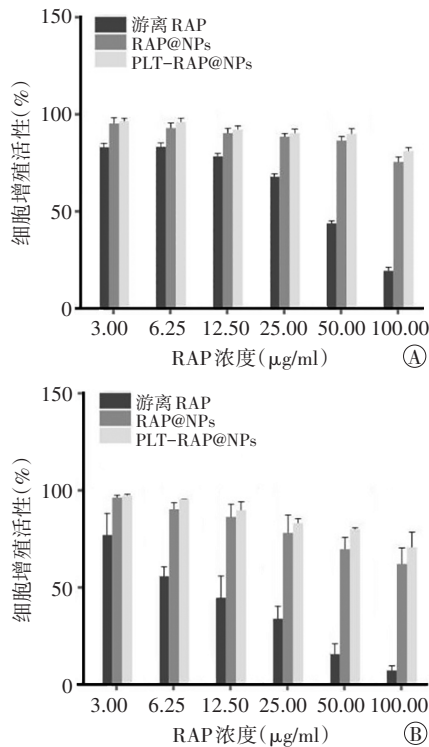


图4 不同浓度RAP下的体外巨噬细胞(A)和血管平滑肌细胞(B)增殖活性图

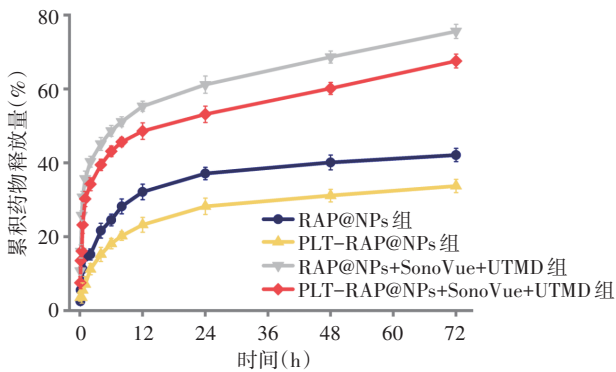


图5 各组体外累积药物释放的曲线图

分、减少斑块面积、提高斑块稳定性,实现抗AS作用。然而,由于药物在体内非靶向分布和不可控的释放特性,传统全身给药方式会导致剂量依赖性不良反应,如头痛、出血、高胆固醇血症、高甘油三酯血症、间质性肺病等^[3]。研究^[4]发现斑块局部靶向给药可有效避免上述不良反应,RAP涂层支架可减少血管炎症,防止血管成形后再狭窄^[5]。Kilroy等^[6]采用血管内超声和装载RAP的微泡联合进行局部药物递送,使治疗所需的RAP剂量明显降低;Dou等^[7]成功制备基于乙酰化 β -环糊精负载RAP的纳米粒,发现其可显著减少AS斑块形成并能增强斑块的稳定性,较口服游离RAP效果更佳,提示RAP持续靶向递送较传统口服给药方式具有更理想的抗AS效果。

纳米靶向递送给药技术可提高生物利用度、降低副作用,但存在被免疫系统视为“异己”成分而清除等问题^[8]。既往实验^[9]采用聚乙二醇(polyethylene glycol, PEG)修饰纳米探针表面,可以有效减少蛋白质吸附、降低内皮网状系统清除率、延长循环时间,但机体仍可以产生特异性PEG抗体,存在被清除的风险^[10]。有学者^[11]提出从血细胞提取细胞膜来修饰包覆纳米粒,其治疗效果优于纯PEG纳米载体。血小板膜包覆的纳米粒模拟血小板,赋予了血小板膜纳米探针天然靶向炎症、受损血管、肿瘤和病原体的病理生理亲和力^[12]。Wei等^[13]实验发现血小板膜纳米探针可与泡沫细胞、内皮细胞和胶原蛋白有效结合,具有良好的靶向性。Song等^[14]成功制备了一种载RAP的血小板膜包覆的纳米探针,表现出对AS斑块的高亲和力和RAP在体内诱导巨噬细胞自噬的高效率。血小板膜仿生纳米靶向递送给药方式提高了药物的生物利用度和靶区域分布浓度,降低了免疫原性,可实现更好的生物相容性和安全性,在AS治疗中具有非常大的应用潜力。

为了证实血小板膜仿生纳米探针能伪装成内源性物质,抑制巨噬细胞识别与吞噬,产生免疫逃逸和增强泡沫细胞摄取,本实验依次应用单乳化-溶剂挥发法、梯度离心-反复冻融法和超声震荡法成功制备PLT-RAP@NPs,其呈球形,大小均匀,表面覆盖一层薄膜、“核-壳”结构清晰,平均粒径(286.83 \pm 5.25)nm,平均表面电位-(15.60 \pm 5.04)mV,稳定性好。当100 mg PLGA负载3 mg RAP时,PLT-RAP@NPs包封率最高,为60.35%,载药率为2.18%。由于RAP@NPs和PLT-RAP@NPs均不含荧光基因,不能直接显示荧光强度,故本实验进一步将细胞与纳米探针共孵育,通过观测封装DiI染料的纳米探针DiI@PLGA和PLT-DiI@PLGA的荧光强度,分别替代RAP@NPs和PLT-RAP@NPs,结果显示相较于DiI@PLGA,PLT-DiI@PLGA可明显抑制巨噬细胞识别与吞噬,增强泡沫细胞摄取。血小板对斑块具有固有的亲和力,其在AS病变每个阶段的招募是由一些黏附分子与炎症内皮细胞、纤维蛋白、胶原蛋白及泡沫细胞相互作用导致^[15],但在高剪切力作用下,不足以使血小板黏附于胶原蛋白上,需有血小板膜糖蛋白(GP Ib)结合vWF介导参与。在受损血管处,GP Ib-vWF-胶原的结合使血小板牢固黏附于内皮下^[16]。本实验采用肿瘤坏死因子- α 刺激人脐静脉内皮细胞高表达vWF,再与纳米探针共孵育,结果显示PLT-DiI@PLGA可明显增强与人脐静脉内皮细胞高表达的vWF结合,从而实现靶向黏附。细胞增殖-毒性实验结果显示,随着RAP浓度增高,游离RAP中细胞

增殖活性呈阶梯式下降,对细胞增殖的影响最大;而 RAP@NPs 和 PLT-RAP@NPs 中细胞增殖活性变化较小,这是由于 RAP@NPs 的纳米结构和 PLT-RAP@NPs 的血小板膜涂层可使 RAP 缓慢释放,纳米药物温和的细胞毒性可减少 RAP 带来的全身不良反应。

UTMD 作为一种靶向递药技术,体内外实验^[17-18]已证明其可以将药物或基因递送至目标组织,并诱导其在特定部位释放,从而实现靶向递送,是一种具有广阔应用前景的治疗策略,且具有无创、无辐射、低免疫原性、低毒性、安全性高、特异性强和可控性等优点^[19]。本实验结果显示,PLT-RAP@NPs 联合 UTMD 后 RAP 释放速率慢于 RAP@NPs,与既往研究^[20]结果相似。分析原因可能为血小板膜的包覆减缓了 RAP 释放,联合 UTMD 的空化效应随即发生微射流、切应力和冲击波等均可导致 PLT-RAP@NPs 纳米探针外包膜破坏,提高 RAP 释放效率。因此,PLT-RAP@NPs 一方面可以通过长效循环缓慢释放,降低循环中因游离药物浓度过高而产生的毒副作用,另一方面联合 UTMD 能提高局部药物浓度,为超声控释增效奠定基础。

综上所述,本实验成功制备 PLT-RAP@NPs,其既可抑制巨噬细胞吞噬实现免疫逃逸,又可有效增强泡沫细胞摄取和内皮细胞黏附能力;PLT-RAP@NPs 联合 UTMD 可实现超声靶向控释,为治疗 AS 提供更高效、优化、安全的新策略。但本实验采用单乳化-溶剂挥发法和超声震荡法制备血小板膜仿生纳米探针,虽较其他制备方法简单、高效、易转化,但存在纳米探针粒径偏大,血小板膜涂层不均匀的情况,后续仍需进一步改进。

参考文献

- Keeter WC, Ma S, Stahr N, et al. Atherosclerosis and multi-organ-associated pathologies[J]. *Semin Immunopathol*, 2022, 44(3):363-374.
- 陈粤瑛,王浩,胡玉刚,等. 靶向声敏纳泡的制备及其声动力效应观察[J]. *临床超声医学杂志*, 2023, 25(1):1-7.
- Liu Y, Yang F, Zou S, et al. Rapamycin: a bacteria-derived immunosuppressant that has anti-atherosclerotic effects and its clinical application[J]. *Front Pharmacol*, 2018, 9(1):1520.
- Craparo EF, Cabibbo M, Conigliaro A, et al. Rapamycin-loaded polymeric nanoparticles as an advanced formulation for macrophage targeting in atherosclerosis[J]. *Pharmaceutics*, 2021, 13(4):503.
- Zaman A, de Winter RJ, Kogame N, et al. Safety and efficacy of a sirolimus-eluting coronary stent with ultra-thin strut for treatment of atherosclerotic lesions (TALENT): a prospective multicentre randomised controlled trial[J]. *Lancet*, 2019, 393(10175):987-997.
- Kilroy JP, Dhanaliwala AH, Klibanov AL, et al. Reducing neointima formation in a swine model with IVUS and sirolimus microbubbles[J]. *Ann Biomed Eng*, 2015, 43(11):2642-2651.
- Dou Y, Guo J, Chen Y, et al. Sustained delivery by a cyclodextrin material-based nanocarrier potentiates antiatherosclerotic activity of rapamycin via selectively inhibiting mTORC1 in mice[J]. *J Control Release*, 2016, 10(8):48-62.
- Barbero F, Russo L, Vitali M, et al. Formation of the protein corona: the interface between nanoparticles and the immune system[J]. *Semin Immunol*, 2017, 34(12):52-60.
- Suk JS, Xu Q, Kim N, et al. PEGylation as a strategy for improving nanoparticle-based drug and gene delivery[J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2016, 99(Pt A):28-51.
- Yang Q, Lai SK. Anti-PEG immunity: emergence, characteristics, and unaddressed questions[J]. *Wiley Interdiscip Rev Nanomed Nanobiotechnol*, 2015, 7(5):655-677.
- Ou LC, Zhong S, Ou JS, et al. Application of targeted therapy strategies with nanomedicine delivery for atherosclerosis[J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2021, 42(1):10-17.
- Han H, Bartolo R, Li J, et al. Biomimetic platelet membrane-coated nanoparticles for targeted therapy[J]. *Eur J Pharm Biopharm*, 2022, 172(3):1-15.
- Wei X, Ying M, Dehaini D, et al. Nanoparticle functionalization with platelet membrane enables multifaceted biological targeting and detection of atherosclerosis[J]. *ACS Nano*, 2018, 12(1):109-116.
- Song Y, Huang Z, Liu X, et al. Platelet membrane-coated nanoparticle-mediated targeting delivery of Rapamycin blocks atherosclerotic plaque development and stabilizes plaque in apolipoprotein E-deficient (ApoE^{-/-}) mice[J]. *Nanomedicine*, 2019, 15(1):13-24.
- Zinger A, Cooke JP, Taraballi F. Biomimetic nano drug delivery carriers for treating cardiovascular diseases[J]. *Nanomedicine*, 2021, 33(4):102360.
- Yang H, Song Y, Chen J, et al. Platelet membrane-coated nanoparticles target sclerotic aortic valves in ApoE^{-/-} mice by multiple binding mechanisms under pathological shear stress[J]. *Int J Nanomedicine*, 2020, 15(2):901-912.
- Alphandery E. Nanomaterials as ultrasound theragnostic tools for heart disease treatment/diagnosis[J]. *Int J Mol Sci*, 2022, 23(3):1683.
- Cao S, Deng Q, Wang Y, et al. Ultrasound-targeted microbubble destruction-mediated Ang1 gene transfection improves left ventricular structural and sympathetic nerve remodeling in canines with myocardial infarction[J]. *Ann Transl Med*, 2021, 9(3):221.
- Li H, Zhang Y, Shu H, et al. Highlights in ultrasound-targeted microbubble destruction-mediated gene/drug delivery strategy for treatment of malignancies[J]. *Int J Pharm*, 2022, 613(1):121412.
- Boada C, Zinger A, Tsao C, et al. Rapamycin-loaded biomimetic nanoparticles reverse vascular inflammation[J]. *Circ Res*, 2020, 126(1):25-37.

(收稿日期:2023-09-06)