·实验研究·

载ANM33双靶标超声脂质微泡在大鼠体内的药动力学特征研究

麦丽和拜·阿斯海提[1,2],陈尚珂[2],穆玉明[1,2]

摘 要 **目的** 探讨载反义核苷酸(ANM33)双靶标超声脂质微泡在大鼠体内的药动力学特征。**方法** 使用超声造影评价琼脂糖凝胶仿体中载ANM33双靶标超声脂质微泡浓度分别为1×10⁴/ml、1×10⁵/ml、1×10⁶/ml、1×10⁷/ml、1×10⁸/ml时的体外显影效果。然后使用紫外光谱分析法确定ANM33溶液的最大吸收波长,分析ANM33标准血浆溶液在0.1~10.0 μg/ml浓度范围的线性关系,建立回归方程;分别使用精密度试验和回收率试验获取不同浓度(0.3、2.5、9.0 μg/ml)ANM33标准血浆样品的日间、日内精密度相对标准偏差(*RSD*)及空白加标回收率;使用样品稳定性试验分析浓度为2.5 μg/ml的ANM33标准血浆样品在25℃室温下放置4 h和-20℃低温下放置5 d的稳定性。将20只SD雄性大鼠随机分为2组,每组各10只,分别经尾静脉注射1.5 ml载ANM33双靶标微泡造影剂和PBS(空白对照),计算ANM33在大鼠体内主要药动力学参数,包括消除半衰期($t_{1/2}$)、最大血药浓度(C_{max})、清除率(CL)、转运速率(K_{21}、K_{12})、0~6 h药物浓度-时间曲线下面积($AUC_{0\sim6}$)、0 h到无穷大药物浓度-时间曲线下面积($AUC_{0\sim\infty}$)。**结果** 超声造影检查结果显示,除浓度为1×10⁵/ml与1×10⁶/ml、1×10⁷/ml与1×10⁸/ml载ANM33双靶标超声脂质微泡的体外显影强度比较差异均无统计学意义外,其余浓度载ANM33双靶标超声脂质微泡的体外显影强度两两比较差异均有统计学意义(均$P<0.05$)。紫外光谱分析法显示,在室温条件下ANM33溶液的最大吸收波长为550 nm,故选取550 nm进行后续实验。ANM33标准血浆溶液在0.1~10.0 μg/ml浓度范围线性关系良好,线性回归方程为:$Y=0.193X+0.024$($r=0.9992$,$P<0.001$)。浓度为0.3、2.5、9.0 μg/ml的ANM33标准血浆样品的日内精密度*RSD*分别为7.40%、5.85%、4.38%,日间精密度*RSD*分别为7.14%、4.93%、3.96%,空白加标回收率为91%~110%。浓度为2.5 μg/ml的ANM33标准血浆样品在25℃室温下放置4 h和-20℃低温下放置5 d均具有较好的稳定性。载ANM33双靶标脂质微泡经大鼠尾静脉注射后,ANM33在血浆中的$t_{1/2}$为(4.70±0.96)h,C_{max}为(7.92±1.95)μg/L,CL为(0.11±0.02)L/h,K_{21}为(0.150±0.020)/h,K_{12}为(0.030±0.004)/h,$AUC_{0\sim6}$(37.11±2.14)μg·h·L⁻¹,$AUC_{0\sim\infty}$为(56.01±4.25)μg·h·L⁻¹。**结论** 载ANM33双靶标超声脂质微泡在大鼠体内达峰时间短、达峰浓度高、起效迅速且生物安全性好,药动力学过程基本符合二室模型,为动脉粥样硬化的治疗及脂质载体类药物的临床转化提供了理论依据。

关键词 载ANM33双靶标超声脂质微泡;紫外光谱分析法;动脉粥样硬化;药动力学;大鼠

[中图法分类号]R445.1 [文献标识码]A

Pharmacokinetic characteristics of ANM33-loaded dual-targeted ultrasound lipid microbubbles in rats

MAILIHEBAI·Asihati[1,2], CHEN Shangke[2], MU Yuming[1,2]

1.Department of Echocardiography, 2.Xinjiang Key Laboratory of Ultrasound Medicine, the First Affiliated Hospital of Xinjiang Medical University, Urumqi 830000, China

ABSTRACT **Objective** To investigate the pharmacokinetic characteristics of ANM33-loaded dual-targeted ultrasound lipid microbubbles in rats.**Methods** The *in vitro* imaging effects of ANM33-loaded dual-targeted ultrasound lipid microbubbles at concentrations of 1×10⁴/ml, 1×10⁵/ml, 1×10⁶/ml, 1×10⁷/ml, and 1×10⁸/ml in agarose gel phantoms were evaluated by contrast-

基金项目:国家自然科学基金项目(82060321);中央引导地方科技发展专项基金项目(ZYYD2023A02);新疆维吾尔自治区自然科学基金项目(2022D01C491);新疆医科大学第一附属医院卓越人才与创新团队培养项目(cxtd202424)

作者单位:1.新疆医科大学第一附属医院心脏超声诊断科,2.新疆超声医学重点实验室,新疆维吾尔自治区 乌鲁木齐 830000

通讯作者:穆玉明,Email:mym1234@126.com

enhanced ultrasound. The maximum absorption wavelength of ANM33 solution was determined by ultraviolet (UV) spectroscopy, and the linear relationship of ANM33 standard plasma solutions within the concentration range of 0.1~10.0 μg/ml was analyzed to establish a regression equation. Precision and recovery tests were used to obtain the relative standard deviation (*RSD*) of intra-day and inter-day precision and the recovery rate of blank spiked samples of ANM33 standard plasma solutions at different concentrations (0.3, 2.5, 9.0 μg/ml). The stability of ANM33 standard plasma samples at a concentration of 2.5 μg/ml was analyzed after being stored at 25℃ for 4 h and at −20°C for 5 d. 20 male SD rats were randomly divided into two groups, 10 rats in each group, and 1.5 ml of ANM33-loaded dual-targeted microbubbles contrast agent or PBS (blank control) was injected via the tail vein. The main pharmacokinetic parameters of ANM33 in rats were calculated, including elimination half-life ($t_{1/2}$), maximum plasma concentration (C_{max}), clearance rate (CL), transfer rates (K_{21}, K_{12}), area under the concentration-time curve from 0~6 h ($AUC_{0\sim6}$), and area under the concentration-time curve from 0 h to infinity ($AUC_{0\sim\infty}$). **Results** Contrast-enhanced ultrasound showed that, except for the comparisons between concentrations of 1×10^5/ml and 1×10^6/ml, 1×10^7/ml and 1×10^8/ml, which showed no statistically significant differences in *in vitro* imaging intensity, all other pairwise comparisons showed statistically significant differences (all $P<0.05$). UV spectroscopy showed that the maximum absorption wavelength of ANM33 solution at room temperature was 550 nm, which was selected for subsequent experiments. The ANM33 standard plasma solutions showed a good linear relationship within the concentration range of 0.1~10.0 μg/ml, with the linear regression equation: $Y=0.193X+0.024$ ($r=0.9992$, $P<0.001$). The intra-day precision *RSD* of ANM33 standard plasma samples at concentrations of 0.3, 2.5, 9.0 μg/ml were 7.40%, 5.85%, 4.38%, respectively, while the inter-day precision *RSD* were 7.14%, 4.93%, 3.96%, respectively. The recovery rate of blank spiked samples ranged from 91% to 110%. The ANM33 standard plasma sample at a concentration of 2.5 μg/ml showed good stability after being stored at 25℃ for 4 h and at −20℃ for 5 d. After intravenous injection of ANM33-loaded dual-targeted lipid microbubbles into the tail vein of rats, the pharmacokinetic parameters of ANM33 in plasma were as follows: $t_{1/2}$ was (4.70±0.96)h, C_{max} was (7.92±1.95)μg/L, CL was (0.11±0.02)L/h, K_{21} was (0.150±0.020)/h, K_{12} was (0.030±0.004)/h, $AUC_{0\sim6}$ was (37.11±2.14)μg·h·L^{-1}, and $AUC_{0\sim\infty}$ was (56.01±4.25)μg·h·L^{-1}. **Conclusion** The pharmacokinetic process of ANM33-loaded dual-targeted ultrasound lipid microbubbles in rats generally conforms to a two-compartment model, characterized by a short time to peak, high peak concentration, rapid onset, and good biosafety, which provides a theoretical basis for the treatment of atherosclerosis and the clinical translation of lipid carrier-based drugs.

KEY WORDS ANM33-loaded dual-targeted ultrasound lipid microbubbles; Ultraviolet spectroscopy; Atherosclerosis; Pharmacokinetic; Rats

动脉粥样硬化(atherosclerosis, AS)是一种慢性炎症性血管疾病,巨噬细胞在其发生发展中具有重要作用,特别是巨噬细胞内微小RNA-33(microRNA-33, miR-33)水平上调与胆固醇外排及胞葬作用等细胞正常生理功能的损伤密切相关[1-5]。大量研究[6-8]显示,通过反义核苷酸(anti-miR-33, ANM33)可降低细胞内miR-33水平,恢复或增强巨噬细胞胆固醇外排及胞葬作用,进一步缓解主动脉斑块区内的炎症反应,但目前尚缺乏有效的载药系统来实现ANM33的靶向递送。本课题组[9-12]前期设计并制备了表面修饰有适配子PM1及透明质酸(hyaluronic acid, HA)的载ANM33双靶标超声脂质微泡,其中HA能够有效避免肝细胞截获并识别CD44受体靶向受损内皮细胞,随后暴露的PM1特异性靶向受损巨噬细胞并进一步实现ANM33细胞级的精准递送,目前ANM33最大有效载量可达7.0 μg/ml,并在体外实验中表现出良好的靶向性和有效性。但在现有制剂及常规给药条件下,ANM33难以在斑块区内高效聚集并发挥疗效,亟需探寻一种高效、便捷的检测方法对载ANM33双靶标超声脂质微泡的体内吸收、代谢等情况进行跟踪分析,并进一步指导制剂工艺和/或给药方案的优化,且这部分药动力学研究的缺失也是限制国内外脂质体纳米药物制剂向临床应用转化的瓶颈因素。本实验通过分析载ANM33双靶标超声脂质微泡在SD大鼠体内的药动力学特征,旨在为探讨其体内作用机制及后期临床转化提供理论依据。

材料与方法

一、主要实验材料、仪器和动物

1. 主要实验材料:载ANM33双靶标超声脂质微泡(实验室自制);ANM33(广州锐博生物技术有限公司);甲醇溶液(深圳博林达科技有限公司);PBS缓冲

液（武汉谷歌生物科技有限公司）；无水乙醇（国药控股北京有限公司）；G-10琼脂糖（广州翔博生物科技有限公司）；无酶水（赛默飞公司）；TBS溶液（北京索莱宝科技有限公司）。

2. 主要实验仪器：移液器（上海诺萱科学仪器有限公司）；电子天平[XPR2U/AC，梅特勒-托利多仪器（上海）有限公司]；超声波清洗机（BUG25-12，宁波新芝生物科技股份有限公司）；旋片式真空泵（2X-1，临海市谭氏真空设备有限公司）；涡旋混合器（QL-901，上海沪西分析仪器厂有限公司）；紫外分光光度计（UV-1780，日本岛津公司）；GE Vivid7彩色多普勒超声诊断仪，探头频率4.0~8.0 MHz，扫描深度3.0 cm；高速冷冻离心机（Fresco17，赛默飞公司）。

3. 实验动物：SPF级雄性SD大鼠20只（由新疆医科大学动物实验中心提供），体质量250~300 g。本实验经我院动物伦理审查委员会批准（批准号：SYSULACUC-2021-B463），所有实验程序均遵循《赫尔辛基宣言》。

二、实验方法

（一）载ANM33双靶标超声脂质微泡体外显影效果评价

采用本课题组前期研究[9-12]中的方法制备载ANM33双靶标超声脂质微泡。称取0.6 g G-10琼脂糖，加入0.5% TBS溶液30 ml，置于微波炉中加热制备成2%琼脂糖凝胶仿体。使用超声造影评价琼脂糖凝胶仿体中载ANM33双靶标超声脂质微泡浓度分别为1×10^4/ml、1×10^5/ml、1×10^6/ml、1×10^7/ml、1×10^8/ml时的体外显影效果，图像的半定量评价使用ImageJ软件。

（二）ANM33的紫外光谱分析法建立及方法学验证

1. 紫外光谱分析法建立：称取2.5 mg ANM33置于25 ml量瓶中，加入甲醇溶液溶解并定容至刻度，摇匀即得到浓度为0.1 mg/ml ANM33甲醇储备液，4℃条件下保存备用。使用前取0.1 ml的ANM33甲醇储备液，用无酶水稀释至浓度为10.0 μg/ml ANM33溶液备用。于25℃室温条件下，以空白溶液作为参照，使用紫外分光光度计于200~800 nm波长范围扫描10.0 μg/ml ANM33溶液，获取光谱图并确定其最大吸收波长。

2. 方法学验证

（1）空白血浆制备：于SD大鼠眼眶静脉丛处采血0.5~1.0 ml，置于经肝素钠处理的离心管中，震荡混匀后离心10 min（12 000 r/min），上层血浆即为空白血浆，-20℃冻存。

（2）线性回归分析：取配置好的ANM33溶液和空白血浆200 μl，配置成浓度为0.1、0.5、1.0、2.5、7.5、10.0 μg/ml的ANM33标准血浆溶液，震荡混匀后在最大吸收波长条件下进行检测，以得到的吸光度为纵坐标，对应的浓度为横坐标，绘制标准曲线，并建立线性回归方程。

（3）精密度试验：取配置好的ANM33甲醇储备液和空白血浆适量，配制成浓度为0.3、2.5、9.0 μg/ml的ANM33标准血浆样品，震荡混匀后在最大吸收波长条件下进行检测：1 d内每隔2 h检测1次ANM33含量，连续检测5次，计算日内精密度相对标准偏差（*RSD*）；将上述标准血浆样品在-20℃冻存，每隔1 d检测1次ANM33含量，连续检测5 d，计算日间精密度*RSD*。

（4）回收率试验：取配置好的ANM33甲醇储备液和空白血浆适量，配制成浓度为0.3、2.5、9.0 μg/ml的ANM33标准血浆样品，震荡混匀后在最大吸收波长条件下连续检测5次，带入标准曲线获得实测样品中ANM33浓度，计算其平均值（C_1）、*RSD*及空白加标回收率，公式为：空白加标回收率=（C_1/C_0）×100%，其中C_0为配置浓度0.3、2.5、9.0 μg/ml。

（5）样品稳定性试验：配置浓度为2.5 μg/ml的ANM33标准血浆样品，震荡混匀后随机分为2组，其中一组在25℃室温下放置4 h，另一组在-20℃低温下放置5 d，计算ANM33标准血浆样品在各时间点的浓度和*RSD*，观察其在室温及低温环境中的稳定性。

（三）体外实验及药动力学参数检测

20只SD雄性大鼠给药前禁食24 h，自由饮水，随机分为2组，每组各10只，分别经尾静脉注射1.5 ml载ANM33双靶标超声脂质微泡造影剂（7.0 μg/ml）和PBS（空白对照，用于计算药动力学参数），于给药前及给药后15 min、30 min、1 h、1.5 h、2 h、4 h、6 h、8 h、12 h和24 h于大鼠眼眶静脉丛处采血0.5 ml，置于经肝素钠处理过的离心管中离心10 min（12 000 r/min），收集上层血浆，-20℃冻存。使用紫外光谱分析法检测各样本中ANM33的血药浓度，绘制药物浓度-时间曲线，计算ANM33在大鼠体内主要药动学参数，包括消除半衰期（$t_{1/2}$）、最大血药浓度（C_{max}）、清除率（CL）、转运速率[包括从周边房室向中央房室的转运速率（K_{21}）和从中央房室向周边房室的转运速率（K_{12}）]、0~6 h药物浓度-时间曲线下面积（$AUC_{0\sim6}$）、0 h到无穷大药物浓度-时间曲线下面积（$AUC_{0\sim\infty}$）。

三、统计学处理

应用GraphPad Prism 8.0.2统计软件和Drug and Statistics 2.1.1药动力学软件，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t检验。$P<0.05$为差异有统计学意义。

结　果

一、载ANM33双靶标超声脂质微泡体外显影效果

不同浓度的载ANM33双靶标超声脂质微泡在琼脂糖凝胶仿体中的显影强度不同（图1）。除浓度为1×10^5/ml与1×10^6/ml、1×10^7/ml与1×10^8/ml载ANM33双靶标超声脂质微泡的体外显影强度比较差异均无统计学意义外，其余浓度载ANM33双靶标超声脂质微泡的体外显影强度两两比较差异均有统计学意义（均$P<0.05$）。见表1。

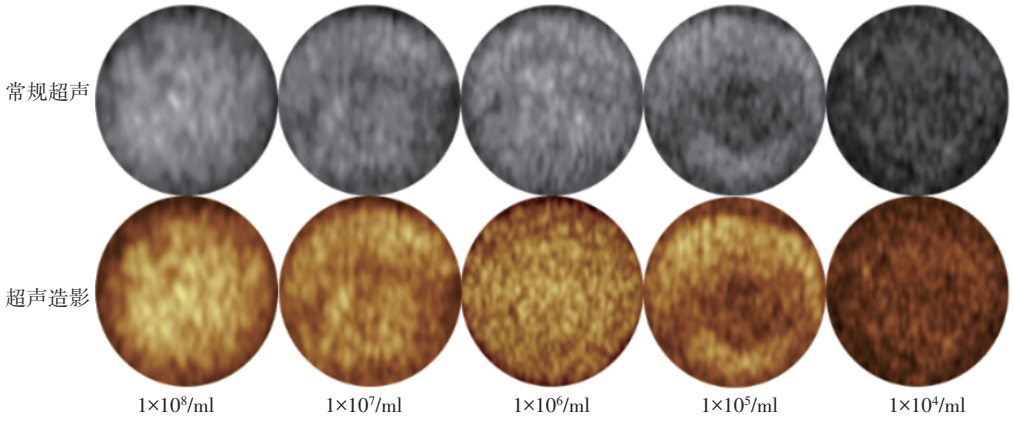

图1　不同浓度的载ANM33双靶标超声脂质微泡体外显影图

表1　不同浓度的载ANM33双靶标超声脂质微泡体外显影强度比较（$\bar{x}\pm s$）

浓度	体外显影强度（a.u.）
1×10^4/ml	22.32±0.69
1×10^5/ml	20.64±0.43*
1×10^6/ml	19.58±0.30*
1×10^7/ml	16.88±0.42*#&
1×10^8/ml	15.73±0.11*#&
F值	116.600
P值	<0.001

与浓度1×10^4/ml比较，*$P<0.05$；与浓度1×10^5/ml比较，#$P<0.05$；与浓度1×10^6/ml比较，&$P<0.05$

二、紫外光谱分析法建立及方法学验证结果

1.最大吸收波长的选取及线性回归分析结果：25℃室温条件下，ANM33溶液在紫外分光光度计上的最大吸收波长为550 nm（图2A），故选取550 nm进行后续实验。ANM33标准血浆溶液在0.1~10.0 μg/ml浓度范围线性关系良好（图2B），线性回归方程为：$Y=0.193X+0.024$（$r=0.9992$，$P<0.001$）。

2.精密度试验结果：浓度为0.3、2.5、9.0 μg/ml的ANM33标准血浆样品的日内精密度RSD分别为7.40%、5.85%、4.38%，日间精密度RSD分别为7.14%、4.93%、3.96%。见表2。

3.回收率试验结果：浓度为0.3、2.5、9.0 μg/ml的

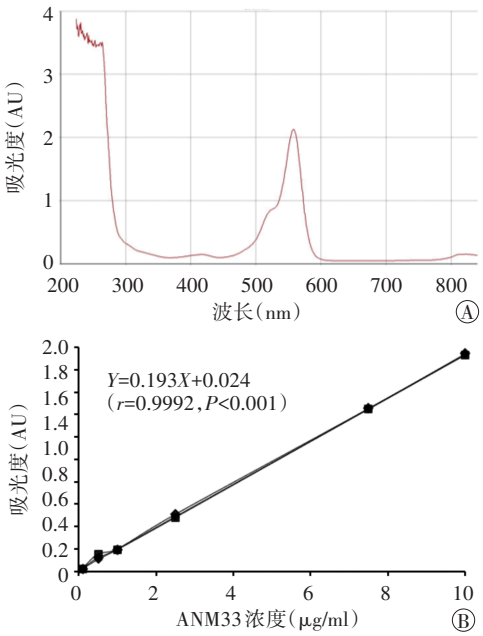

图2　ANM33的紫外光谱分析图（A）及紫外吸收标准曲线图（B）

ANM33标准血浆样品的空白加标回收率为91%~110%（均$RSD<10\%$）。见表3。

4.样品稳定性试验结果：浓度为2.5 μg/ml的ANM33标准血浆样品25℃室温下放置0、1、2、3、4 h的浓度分别为2.55、2.52、2.49、2.46、2.45 μg/ml，平均浓度2.49 μg/ml，RSD为1.3%；−20℃低温下放置0 d和5 d的

表2 不同浓度ANM33标准血浆样品中日间、日内精密度的ANM33含量及*RSD*

浓度	日内精密度		日间精密度	
	ANM33含量(μg/ml)	*RSD*(%)	ANM33含量(μg/ml)	*RSD*(%)
0.3 μg/ml	0.27±0.02	7.40	0.28±0.02	7.14
2.5 μg/ml	2.56±0.15	5.85	2.43±0.12	4.93
9.0 μg/ml	8.66±0.38	4.38	8.58±0.34	3.96

ANM33:反义核苷酸;*RSD*:相对标准偏差

表3 不同浓度ANM33标准血浆样品中ANM33 C_1、空白加标回收率及*RSD*

浓度	C_1(μg/ml)	空白加标回收率(%)	*RSD*(%)
0.3 μg/ml	0.31±0.02	103.3±7.0	6.45
2.5 μg/ml	2.46±0.13	98.4±5.2	5.28
9.0 μg/ml	8.53±0.32	94.7±3.6	3.75

C_1:平均值;*RSD*:相对标准偏差

浓度分别为2.51、2.47 μg/ml,*RSD*为1.2%。

三、体外实验及药动力学检测结果

药物浓度-时间曲线显示,载ANM33双靶标超声脂质微泡经大鼠尾静脉注射后,可在15 min内达到血药浓度峰值,4 h仍保留75%以上ANM33,4~6 h迅速下降至基本清除。见图3。

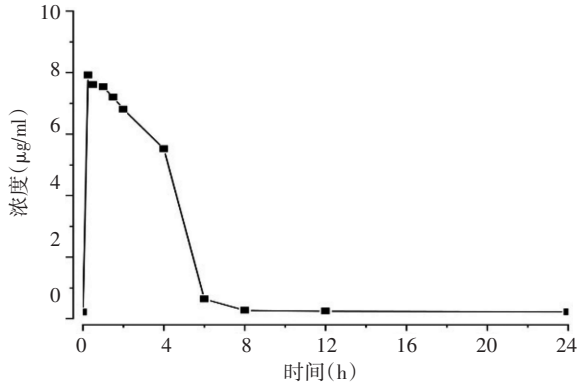

图3 大鼠血浆中ANM33的药物浓度-时间曲线图

采用Drug and Statistics 2.1.1药动力学软件对各时间点的血药浓度进行拟合分析,获得药动力学参数,ANM33在大鼠血浆中的$t_{1/2}$为(4.70±0.96)h,C_{max}为(7.92±1.95)μg/L,CL为(0.11±0.02)L/h,K_{21}为(0.150±0.020)/h,K_{12}为(0.030±0.004)/h,$AUC_{0\sim6}$为(37.11±2.14)μg·h·L^{-1},$AUC_{0\sim\infty}$为(56.01±4.25)μg·h·L^{-1}。

讨 论

目前关于ANM33基因靶向治疗药物的药效及药理学研究已有报道[13-14],但有关载ANM33双靶标超声脂质微泡的药动力学研究仍不足,对关键指标成分在生物体内随时间变化的规律进行定量监测,有助于确定药物在体内的生物利用度、作用时间和所需剂量,可以判断药物的安全性、蓄积毒性等[15-16]。与普通药物相比,纳米/微米级载体药物因特殊尺度效应和纳米结构效应等理化特性,使其具有特殊的生物学特性,导致其药动力学特征与普通药物存在较大差异。目前关于脂质载体类药物的药动力学研究相对较少,因此研究脂质载体类微泡的药动力学信息对探讨其临床安全性和有效性具有重要意义。

本课题组前期成功制备了以特异性靶向受损内皮细胞的HA为一级靶向探针,靶向泡沫细胞的适配子PM1为二级寻靶物质,ANM33为效应分子的载ANM33双靶标超声脂质微泡,拟利用分级寻靶策略将ANM33精准递送至AS斑块区功能受损的泡沫细胞中,有效避免非选择性抑制miR-33对正常生理活动的影响。体外研究[10-12]结果显示,ANM33双靶标超声脂质微泡靶向释放效率是非靶向释放效率的5倍以上,有效促进了泡沫细胞凋亡,并恢复了巨噬细胞胆固醇外排功能;HA包裹不仅极大提高了脂质微泡的稳定性,且在纳米粒周围形成亲水性基质使ANM33在72 h内持续稳定释放。本实验以载ANM33双靶标超声脂质微泡为研究对象,建立能够对大鼠血浆中ANM33进行定量分析的紫外光谱分析法,并进行了方法学验证,结果显示ANM33标准血浆溶液在0.1~10.0 μg/ml浓度范围线性关系良好;标准血浆样品的日内及日间精密度良好(均*RSD*<10%),空白加标回收率为91%~110%(均*RSD*<10%);且在室温及低温环境中的稳定性均较好(均*RSD*<10%),表明本实验建立的紫外光谱分析法在准确度、精密度、回收率及稳定性方面均符合生物样品分析要求,能够有效检出生物样品中ANM33,是评价载ANM33双靶标超声脂质微泡体内药动力学较为理想的方法。

本实验进一步以7.0 μg/ml载ANM33双靶标超声脂质微泡经大鼠尾静脉注射给药进行药动力学研究,结果显示载ANM33双靶标超声脂质微泡入血后可在15 min内达到血药浓度峰值,4 h仍保留75%以上,4~6 h迅速下降至基本清除,药物浓度-时间曲线符合药动学规律。此外,大鼠血浆中ANM33主要药动力学参数C_{max}为(7.92±1.95)μg/L,$AUC_{0\sim6}$为(37.11±2.14)μg·h·L^{-1},$AUC_{0\sim\infty}$为(56.01±4.25)μg·h·L^{-1},符合有效治疗剂量要求,药动力学过程符合二室模型描述;且K_{21}[(0.150±0.020)/h]大于K_{12}[(0.030±0.004)/h],说明载ANM33双靶标超声脂质微泡易于灌注,入体后会快速进入心

脏等血流丰富的脏器从而发挥其药效，且$t_{1/2}$为(4.70±0.96)h，CL为(0.11±0.02)L/h，属于快速消除类药物，生物安全性好。鉴于载ANM33双靶标超声脂质微泡在体内的代谢过程具有吸收快、消除快的特点，且细胞毒性小、无溶血反应，后期可调整给药间隔为1~3个半衰期，以维持药物有效治疗浓度，从而提高模型动物治疗效果。

本实验的局限性：①仅对ANM33在大鼠体内的药动力学特征进行初步评估，后续还需针对组织分布、代谢、排泄产物及途径等深入探讨；②计算药动力学参数时未设置对照组，也未排除生物体内核酸酶对ANM33的降解作用，今后需进一步分析。

综上所述，载ANM33双靶标超声脂质微泡在大鼠体内达峰时间短、达峰浓度高、起效迅速且生物安全性好，药动力学过程基本符合二室模型，有望为AS的预防和治疗提供一种新的药物选择，为后期AS治疗及脂质载体类药物的临床转化提供了理论依据。

参考文献

[1] Libby P, Loscalzo J, Ridker PM, et al. Inflammation, immunity, and infection in atherothrombosis: JACC review topic of the week[J]. J Am Coll Cardiol, 2018, 72(17): 2071-2081.

[2] Yang Y, Kong Q, Ma X, et al. A whole-scope evaluation of cervicocephalic atherosclerotic burden is essential to predict 90-day functional outcome in large-artery atherosclerotic stroke[J]. J Atheroscler Thromb, 2022, 29(10): 1522-1533.

[3] Miao B, Hernandez AV, Alberts MJ, et al. Incidence and predictors of major adverse cardiovascular events in patients with established atherosclerotic disease or multiple risk factors[J]. J Am Heart Assoc, 2020, 9(2): e014402.

[4] Li Z, Lin L, Wu H, et al. Global, regional, and national death, and disability-adjusted life-years (DALYs) for cardiovascular disease in 2017 and trends and risk analysis from 1990 to 2017 using the global burden of disease study and implications for prevention [j]. front public health, 2021, 29: 559751.

[5] Roth GA, Mensah GA, Johnson CO, et al. Global Burden of Cardiovascular Diseases and Risk Factors, 1990-2019: Update from the GBD 2019 Study[J]. J Am Coll Cardiol, 2020, 76(25): 2982-3021.

[6] Degoma EM, Rader DJ. Novel HDL-directed pharmacotherapeutic strategies[J]. Nat Rev Cardiol, 2011, 8(5): 266-277.

[7] Yang X, Wang L, Zhang Z, et al. Ginsenoside Rb_1 enhances plaque stability and inhibits adventitial vasa vasorum via the modulation of miR-33 and PEDF[J]. Front Cardiovasc Med, 2021, 28: 654670.

[8] Majdalawieh A, Ro HS. PPARγ1 and LXRα face a new regulator of macrophage cholesterol homeostasis and inflammatory responsiveness, AEBP1[J]. Nucl Recept Signal, 2010, 16: e004.

[9] 袁晨. 分阶段寻靶的载anti-miR33的双靶标脂质微泡的制备及体外实验[D]. 乌鲁木齐：新疆医科大学，2022.

[10] Yuan C, Li Y, Liu L, et al. Experimental study on the compatibility and characteristics of a dual-target microbubble loaded with anti-miR-33[J]. Nanomedicine, 2021, 16: 6265-6280.

[11] Yuan C, Liu L, Tayier B, et al. Experimental study on the optimization of ANM33 release in foam cells[J]. Open Life Sci, 2023, 18(1): 20220564.

[12] 刘芮宁，陈尚珂，拜合提亚·塔依尔，等. 载ANM33双靶标脂质超声微泡精准胞内释药可行性的体外研究[J]. 中华超声影像学杂志，2024，33(7)：617-625.

[13] Yuan C, Li Y, Liu L, et al. Experimental study on the compatibility and characteristics of a dual-target microbubble loaded with anti-miR-33[J]. Int J Nanomedicine, 2021, 16: 6265-6280.

[14] Karunakaran D, Thrush AB, Nguyen MA, et al. Macrophage mitochondrial energy status regulates cholesterol efflux and is enhanced by anti-miR33 in atherosclerosis[J]. Circ Res, 2015, 117(3): 266-278.

[15] 庞伊伶. 脂质纳米粒载体材料DMG-PEG2000的药动力学研究[D]. 长春：吉林大学，2022.

[16] 崔文宁. 那格列奈对利伐沙班在大鼠体内药动学及药效学的影响[D]. 石家庄：河北医科大学，2015.

[17] Chu D, Dong X, Zhao Q, et al. Photosensitization priming of tumor microenvironments improves delivery of nanotherapeutics via neutrophil infiltration[J]. Adv Mater, 2017, 29(27): 10.

[16] 肖箫，陈俊宇，李彩霞，等. 纳米载体作为药物递送系统的临床应用和药动力学研究[J]. 药学学报，2023，58(4)：856-866.

（收稿日期：2024-09-12）