

巨噬细胞膜仿生纳米给药系统的制备及性能

陈 晋, 丁 尧, 肖新荣*

(南华大学 化学化工学院, 湖南 衡阳 421001)

摘要: 首先, 将 β -环糊精 (β -CD) 修饰在具有乙二胺核的聚酰胺-胺 (PAMAM) 树枝状聚合物 5.0 代 (PAMAM G5.0) 表面, 构筑了 CD-G5 载药腔; 然后, 将疏水性抗炎药姜黄素 (CUR) 作为模型药物负载于 CD-G5 内, 得到了负载 CUR 的纳米粒子 (CURNPs); 最后, 在 CURNPs 外包裹具有免疫逃逸反应和药物缓释作用的巨噬细胞膜 (MM), 制备了仿生纳米给药系统 (MM@CURNPs)。采用 FTIR、¹HNMR 对 CD-G5 进行了表征; 通过 TEM 和纳米粒度分布仪对 MM@CURNPs 的微观形貌和粒径分布进行了测定, 基于药物释放实验和体外细胞毒性、巨噬细胞摄取实验, 进行了 MM@CURNPs 的缓释性能和体外活性评价。结果表明, CURNPs 经 MM 包覆后, MM@CURNPs 平均粒径 (162.2 nm) 增大 13.9 nm; MM@CURNPs 放置 1 d 时平均粒径为 162.2 nm, 10 d 时平均粒径为 238.6 nm; CURNPs 载药率为 9.60%, MM@CURNPs 体外释药速率较 CURNPs 慢, 72 h 累积释放量达到约 50%; MM@CURNPs 比 PAMAM G5.0 和 CURNPs 的毒性小, 即使在浓度 1000 nmol/L 下, 小鼠单核巨噬细胞白血病细胞 (Raw 264.7 细胞) 仍具有 90% 的活性; MM 上保留有巨噬细胞固有膜蛋白和功能, 可以帮助 MM@CURNPs 具备巨噬细胞免疫逃逸功能, 4 h 时, Raw 264.7 细胞对荧光标记的 MM@CURNPs 粒子摄取的平均荧光强度为 72, Raw 264.7 细胞对荧光标记的 CURNPs 粒子摄取的平均荧光强度为 80。

关键词: 仿生纳米给药系统; 聚酰胺-胺树枝状聚合物; β -环糊精; 巨噬细胞膜; 姜黄素; 功能材料
中图分类号: Q811.7; TB383.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 1003-5214 (2026) 03-0524-08

Preparation and properties of macrophage membrane biomimetic nano drug delivery system

CHEN Jin, DING Yao, XIAO Xinrong*

(School of Chemistry and Chemical Engineering, University of South China, Hengyang 421001, Hunan, China)

Abstract: β -cyclodextrin (β -CD) was grafted onto the surface of polyamide-amine (PAMAM) dendritic polymer with ethylenediamine nucleus, 5.0 generation (PAMAM G5.0) to synthesize a CD-G5 drug-carrying cavity, into which hydrophobic anti-inflammatory drug curcumin (CUR) was loaded as a model drug to obtain CUR-loaded nanoparticles (CURNPs). Finally, a bionic nanodrug delivery system (MM@CURNPs) was constructed by wrapping macrophage membranes (MM) with immune escape response and slow drug release outside the CURNPs. The structure of CD-G5 was characterized by FTIR and ¹HNMR. The microscopic morphology and particle size distribution of MM@CURNPs were analyzed by TEM and nano-particle size distribution meter, followed by evaluation on the slow-release performance and *in vitro* activity of MM@CURNPs based on the drug release assay, *in vitro* cytotoxicity and macrophage uptake assay. The results showed that the average particle size (162.2 nm) of MM@CURNPs was increased by 13.9 nm compared with that of CURNPs by MM coating. The average particle size of MM@CURNPs was 162.2 nm when stored for 1 d, and 238.6 nm when stored for 10 d. The drug loading rate of CURNPs was 9.60%, and the *in vitro* drug release rate of MM@CURNPs was slower than that of CURNPs, with the cumulative release reaching ~50% at 72 h. MM@CURNPs were less toxic than PAMAM G5.0 and CURNPs, with mouse monocyte macrophage leukemia cells (Raw 264.7 cells) showing

收稿日期: 2025-02-20; 定用日期: 2025-04-03; DOI: 10.13550/j.jxhg.20250118

基金项目: 国家自然科学基金项目 (2020JJ6051)

作者简介: 陈 晋 (1997—), 女, 硕士生, E-mail: 3020817860@qq.com。联系人: 肖新荣 (1963—), 男, 教授, E-mail: xrr63xiao@qq.com。

90% activity even at a concentration of 1000 nmol/L. MM retained its macrophage-intrinsic membrane proteins and functions, which brought to MM@CURNPs with macrophage immune escape function, and at 4 h, the average fluorescence intensity of Raw 264.7 cells to fluorescently labeled MM@CURNPs particles uptake was 72, with the average fluorescence intensity of Raw 264.7 cells to fluorescently labeled CURNPs particles uptake of 80.

Key words: biomimetic nano drug delivery system; polyamide-amine dendritic polymer; β -cyclodextrin; macrophage membrane; curcumin; functional materials

据世界卫生组织 2023 年统计数据显示,心血管疾病是目前全球人口因病死亡最主要的原因,其导致的死亡人数占全球因病死亡人数的 32%。动脉粥样硬化是引起心血管疾病的主要病理学基础^[1-2]。动脉粥样硬化是一种慢性炎症性心血管疾病,其特征是在动脉层内形成粥样斑块的脂肪沉积^[3-4]。目前,用于动脉粥样硬化治疗的药物有降脂药他汀类药物和抗血小板药阿司匹林,然而这些药物作用于全身,容易引发不良反应,例如:他汀类药物引起肌炎和肌痛;阿司匹林引起胃肠道出血、溃疡和耐药性增加^[5-8]。因此,探索新的治疗动脉粥样硬化的策略具有现实意义。

研究表明,降低炎症是减少动脉粥样硬化的一种有前途的新策略^[9-11]。姜黄素(CUR)是从中药姜黄中提取的一种天然多酚类化合物,具有抗炎、抗氧化、抗肿瘤和抗动脉粥样硬化等功效^[12-13]。在动脉粥样硬化小鼠模型中,CUR 治疗可有效减少主动脉粥样硬化病变面积,并降低血脂和炎症^[14]。但 CUR 水溶性差、生物利用度低、在生物体内不稳定,因此,临床应用受到限制^[15-16]。

纳米材料在药物递送系统发挥着重要的作用,其作为载体可以改善疏水药物的溶解性,增加药物的稳定性,提高药品的生物利用率^[17-18]。然而,外源性纳米药物载体容易被免疫系统识别为异物并排出机体^[19],导致药物难以到达靶点病变部位,无法实现体内长效循环。对此,研究者们尝试用红细胞膜、血小板细胞膜、巨噬细胞膜(MM)和癌细胞膜等内源性的细胞膜对纳米粒子进行修饰,从而达到免疫逃逸的效果^[20-21]。此外,MM 表面存在 $\alpha_4\beta_1$ 整合蛋白,可以识别并结合动脉粥样硬化斑块处的炎症内皮细胞高表达的血管细胞黏附分子-1(VCAM-1)^[22-23],从而实现药物递送载体对动脉粥样硬化斑块的靶向靠近,即 MM 包覆的纳米粒子既有对动脉粥样硬化斑块炎症部位的靶向性,又具有系统免疫逃逸功能。

聚酰胺-胺(PAMAM)树枝状聚合物和 β -环糊精(β -CD)在药物递送方面具有广泛的应用。PAMAM 本身具有低毒性、无免疫原性,其内部的空腔具有疏水性,可以负载小分子药物,提高药物的溶解性

和稳定性^[24-26]。FICKER 等^[27]使用 PAMAM 负载吡啶美辛构建了一种药物递送载体,提高了药物的溶解度,延长了血液循环时间。 β -CD 含有 7 个 D-吡喃葡萄糖单体,呈现上端大、下端小的圆台空腔立体结构^[28],空腔内部存在碳氢键和环醚氧原子形成的内部疏水区,其羟基朝向上下边缘两侧的外空间,因此, β -CD 具有外部亲水而内部疏水的特点^[29],各种小分子药物可通过分子间作用力或疏水作用力进入其空腔内部形成稳定的包合物。HU 等^[30]制备了乳酸链球菌素与环糊精羧酸琥珀酸- β -环糊精(SACD)的络合物,在中性和碱性条件下均表现出良好的溶解性,并且在高蒸汽灭菌处理过程中保持较高的 pH 后仍具有良好的稳定性。

本文拟选用具有乙二胺核的 PAMAM 树枝状聚合物 5.0 代(PAMAM G5.0)甲醇溶液作为基体,将 β -CD 修饰在 PAMAM G5.0 表面,构成 CD-G5 载药腔。然后,将疏水性抗炎药 CUR 作为模型药物负载于 CD-G5 内,得到负载 CUR 的纳米粒子(CURNPs)。最后,在 CURNPs 外包裹 MM,制备 MM@CURNPs 仿生纳米给药系统,并对 MM@CURNPs 进行系列的结构和性能测试以及生物评价。以期探索新的治疗动脉粥样硬化的策略提供思路。

1 实验部分

1.1 材料、试剂与仪器

Hoechst33258 染色试剂盒,上海笛柏生物科技有限公司;细胞膜蛋白与细胞浆蛋白提取试剂盒,上海碧云天生物技术股份有限公司;小鼠单核巨噬细胞白血病细胞(Raw 264.7 细胞),南华大学药学院;DMEM 培养基,美国 Merck 公司;聚碳酸酯多孔膜,奥维斯丁(上海)纳米技术有限公司;透析袋〔截留相对分子质量(MWCO)为 8000~14000〕,美国 Union Carbide 公司。

PAMAM G5.0 甲醇溶液(PAMAM G5.0 质量分数为 5%)、 β -CD(AR,经去离子水重结晶后使用)、D₂O(质量分数 99.9%),上海麦克林生化科技股份有限公司;二甲基亚砜(DMSO)、磷酸盐缓冲液(PBS, pH=7.2~7.4)、多聚甲醛固定液(质量浓度

40 g/L, PBS 为溶剂)、异硫氰酸荧光素 (FITC)、CUR, AR, 上海泰坦科技股份有限公司; *N,N*-羰基二咪唑, AR, 安徽乐研生物医药科技有限公司。

UV-8000 型紫外-可见分光光度计 (UV), 上海元析仪器有限公司; Nicolet iS5 型傅里叶变换红外光谱仪 (FTIR), 美国 Thermo Fisher Scientific 公司; BeNano 90 型纳米粒度分布仪, 丹东百特仪器有限公司; WYS-37XBY 型荧光显微镜, 天津微仪光学仪器有限公司; WP-160C02 型细胞摇床, 上海靳澜仪器制造有限公司; LC-CBG-80S 型细胞培养箱, 上海力辰仪器科技有限公司; LiposoFast™-Basic 型微型脂质体挤出器, 奥维斯丁(上海)纳米技术有限公司; CR22N 型高速低温离心机, 德国 Eppendorf 公司; KQ-100DE 型超声清洗仪, 江苏昆山市超声仪器有限公司; JEM-2010F 型透射电子显微镜 (TEM), 日本电子株式会社; ELx800 酶标仪, 美国 Bio Tek 公司。

1.2 方法

1.2.1 CD-G5 (化合物 I) 制备

首先, 将 0.1 g (88.1 nmol) β -CD 溶于 5 mL 二甲基亚砜中, 加入 5.0 mg *N,N*-羰基二咪唑作为催化剂 (占 β -CD 质量的 5%), 室温下反应 4 h。然后, 用移液枪吸取 500 μ L (6.88×10^{-4} nmol) PAMAM G5.0 甲醇溶液, 吹干甲醇溶剂后, 加入 5 mL 二甲基亚砜溶解, 缓慢地滴加至上述反应液中, N_2 保护下, 室温避光反应 72 h。反应结束后, 将反应液装入透析袋, 在去离子水中透析 72 h。透析结束后, 经 -55 $^{\circ}$ C 冷冻干燥 24 h, 得到白色絮状产物 0.0025 g, 记为 CD-G5。 1 HNMR (500 MHz, D_2O), δ : 2.75~2.34 (m, $-NCH_2CH_2N-$), 2.87 (d, $-CONHCH_2CH_2N-$), 3.12 (t, $-NCH_2CH_2CONH-$), 3.30 (s, $-CONHCH_2CH_2N-$), 3.48 (t, $-CONHCH_2CH_2NH-CO-O-\beta-CD$), 3.86 (t, $H_{2-6}-\beta-CD$), 5.03 (s, $H_1-\beta-CD$)。

1.2.2 CURNPs (化合物 II) 制备

精密称取 1 mg 的 CD-G5 溶于 1 mL 二甲基亚砜中, 加入 0.25 mg (678.5 nmol) CUR 充分振荡, 得到油相。将油相逐滴加入到剧烈搅拌的 4 mL 超纯水中, 于 45 $^{\circ}$ C 下反应 3 h 后, 将溶液装入透析袋, 在去离子水中透析 72 h, 去除游离的 CUR 及二甲基亚砜。透析完成后, 经 -55 $^{\circ}$ C 冷冻干燥 24 h, 得到黄色粉末状产物 1.107 mg, 记为 CURNPs。

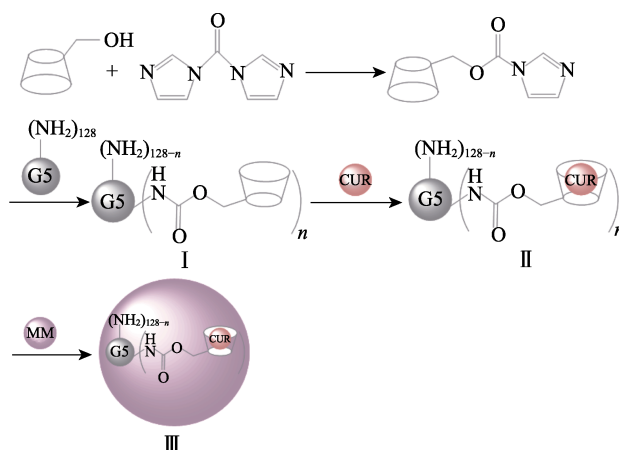
1.2.3 MM@CURNPs (化合物 III) 制备

取 $2 \times 10^7 \sim 5 \times 10^7$ 个在细胞培养皿中生长至融合度为 80% 以上的 Raw 264.7 细胞, 先用 PBS 洗一遍, 然后将细胞从壁上刮下, 使用移液枪吹打, 于 600 r/min、 4 $^{\circ}$ C 离心 5 min, 收集细胞, 小心吸除上

清液。向沉淀中加入 1 mL 细胞膜蛋白与细胞浆蛋白提取试剂, 并充分吹打混匀, 使细胞悬浮, 在冰浴中放置 15 min 后, 在玻璃匀浆器中匀速匀浆 40~50 次, 使用显微镜观察匀浆后的细胞, 当观察到细胞匀浆液中 70% 以上细胞无核周晕环和完整细胞形态则表明细胞充分破碎。将破碎好的细胞匀浆液在 700 r/min、 4 $^{\circ}$ C 离心 10 min, 去除细胞核和未破碎的细胞。收集上清液, 在 14000 r/min、 4 $^{\circ}$ C 离心 30 min, 小心吸除上清液, 沉淀即为 MM。

采用超声法和挤压法制备 MM 包覆的 CURNPs 粒子。具体步骤为: 首先, 将提取的 MM 重悬于 5 mL 超纯水中, 称取 1 mg CURNPs 溶于 3 mL 超纯水中, 将上述两液混合, 超声 3 min, 促进 MM 与 CURNPs 的相互作用; 接着, 用脂质体挤出器依次在 1000、400、200 nm 的聚碳酸酯多孔膜下多次匀速挤出, 得到 MM@CURNPs 悬浮液。

MM@CURNPs 制备路线如下所示。



1.3 结构表征与性能测试

FTIR 测试: KBr 压片法, 波数范围 $4000 \sim 500$ cm^{-1} , 分辨率 4 cm^{-1} , 扫描次数 32 次。 1 HNMR 测试: 以 D_2O 作为 CD-G5 的溶剂, 在 500 MHz 和 25 $^{\circ}$ C 下测定 CD-G5 的 1 HNMR 谱图。UV-Vis 测试: 25 $^{\circ}$ C 下, 在 $200 \sim 600$ nm 范围内分别对质量浓度为 20 μ g/mL 的 CUR 和 CURNPs 二甲基亚砜溶液进行扫描。TEM 测试: 配制质量浓度 2 g/L 的 CURNPs 水溶液和 MM@CURNPs 水溶液, 通过 TEM 对 CURNPs 和 MM@CURNPs 进行形貌表征。粒度测试: 配制质量浓度 10 g/L 的 CURNPs 水溶液和 MM@CURNPs 水溶液, 用纳米粒度分布仪进行粒径测试, MM@CURNPs 水溶液保存于 4 $^{\circ}$ C, 并在随后的 3、5、7、10 d 对其再次取样, 进行粒径测试。

1.4 载药与释药性能测试

1.4.1 纳米粒子载药测试

CUR 溶液标准曲线的建立: 配制质量浓度为 5 g/L 的 CUR 二甲基亚砜母液, 再用二甲基亚砜稀

释为质量浓度 30、20、15、10、5、3、1.5、0.75 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的标准溶液。用 UV-Vis 测定各质量浓度标准溶液在 431 nm (CUR 的特征波长) 下的吸光度, 用 Origin 绘制 CUR 质量浓度 (y , $\mu\text{g}/\text{mL}$) - 吸光度 (x) 标准曲线, 并得到标准曲线拟合方程: $y=10.321x-0.5787$, $R^2=0.9998$ 。

载药率和包封率测定: 将 2 mg (m_0) 的 CURNPs 溶于 100 mL 二甲基亚砜中, 配成质量浓度为 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的样品液, 用 UV-Vis 测得样品液在 431 nm 处的吸光度, 根据 CUR 质量浓度-吸光度标准曲线方程得到样品液中 CUR 的质量浓度, 再按照式 (1) 和 (2) 计算 CURNPs 的载药率 (%) 和包封率 (%)。

$$\text{载药率}/\% = m_1/m_0 \times 100 \quad (1)$$

$$\text{包封率}/\% = m_1'/m_0' \times 100 \quad (2)$$

式中: m_1 为根据标准曲线方程计算得到的样品液中 CUR 质量, mg; m_1' 为 CD-G5 的载药量; m_0' 为投药量, 0.25 mg。

1.4.2 纳米粒子释药测试

首先, 将 1 mL 质量浓度为 1 g/L 的 CURNPs 水溶液和 MM@CURNPs 水溶液分别倒入透析袋中, 然后将透析袋置于 29 mL PBS 中, 并设置温度为 37 $^{\circ}\text{C}$ 来模拟体内环境。在药物释放的第 0.5、1、2、4、8、12、24、36、48、60、72 h 取出 4 mL PBS 释放液, 并补充 4 mL 新鲜的 PBS。用 UV-Vis 测定释放液中 CUR 的质量浓度, 并根据式 (3) 计算 CURNPs 和 MM@CURNPs 体外药物累积释放率 (%), 绘制体外药物释放曲线。

药物累积释放率/ $\% =$

$$[\rho_n \times V + V_c \times (\rho_1 + \dots + \rho_{n-1})] / m \times 100 \quad (3)$$

式中: V 为释放体系的恒定体积, 30 mL; V_c 为 PBS 置换体积, 4 mL; n 是置换 PBS 的次数; ρ_n 是第 n 次取样液中 CUR 的质量浓度, $\mu\text{g}/\text{mL}$; m 为纳米粒子所载的药物总质量, μg 。

1.5 CURNPs 体外生物活性评价

1.5.1 细胞复苏与传代

取冻存的 Raw 264.7 细胞于 37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴解冻, 离心除去上清液, 然后用剩余液体将细胞吹散, 将所有液体移至细胞培养瓶中, 加入 5 mL DMEM 培养基, 混匀后在 37 $^{\circ}\text{C}$ 、体积分数 5% 的 CO_2 条件下培养, 当细胞长至融合度为 80% 以上, 按照 1:2 (将原细胞培养瓶中含细胞的培养液均分到两个培养瓶中继续培养, 并补充培养基至与原培养液相同的体积) 进行传代培养。

1.5.2 体外细胞毒性实验

采用 MTT 比色法探究巨噬细胞在不同质量浓度的 PAMAM G5.0、CURNPs 和 MM@CURNPs 样品溶液孵育下的活性。将培养好的巨噬细胞 Raw

264.7 用 DMEM 培养基调整至 5×10^4 个/mL, 按每孔 200 μL 的体积接种至 96 孔板中, 并在 37 $^{\circ}\text{C}$ 、体积分数 5% 的 CO_2 条件下培养 24 h。随后, 去除 DMEM 培养基。实验组每孔加入 180 μL DMEM 培养基, 然后每孔分别加入 20 μL 浓度梯度为 50~1000 nmol/L 的 PAMAM G5.0、CURNPs 和 MM@CURNPs 样品溶液; 对照组每孔加入 180 μL DMEM 培养基和 20 μL 二甲基亚砜; 空白组不接种细胞, 每孔加入 200 μL DMEM 培养基。所有组设置 5 个复孔。继续培养 24 h 后, 每个孔中添加 10 μL (质量浓度 5.0 g/L) 的 MTT 溶液, 孵育 4 h 后吸除培养基, 向每孔中加入 150 μL 二甲基亚砜, 25 $^{\circ}\text{C}$ 、100 r/min 细胞摇床中振荡 30 min, 使甲瓚结晶充分溶解。用酶标仪测定 570 nm 处各个孔中的光密度 (OD 值), 再按照式 (4) 评估细胞活性水平。

细胞活性/ $\% = (\text{实验组 OD} - \text{空白组 OD}) /$

$$(\text{对照组 OD} - \text{空白组 OD}) \times 100 \quad (4)$$

1.5.3 巨噬细胞摄取实验

异硫氰酸荧光素 (FITC, 绿色) 标记纳米粒子^[31], 制得 CURNPs-FITC、MM@CURNPs-FITC 纳米粒子, 与细胞共孵育后, 监测纳米粒子被巨噬细胞摄取情况。

将 Raw 264.7 巨噬细胞接种到 24 孔板中, 培养 12 h。随后, 实验组分别加入 CURNPs-FITC、MM@CURNPs-FITC 样品溶液, 对照组加入等量的二甲基亚砜, 分别孵育 1、2、4 h, PBS 清洗 3 遍后, 加入多聚甲醛固定液固定 20 min, 然后每孔加入 500 μL 的 Hoechst33258 染液 (蓝色), 于 37 $^{\circ}\text{C}$ 染色 15 min, PBS 洗去游离染料, 用荧光显微镜拍摄荧光图。通过 Image J (Fiji) 软件对荧光图进行平均荧光强度定量分析, 并用 Graphpad Pism 软件绘制荧光定量分析图。

2 结果与讨论

2.1 表征结果分析

图 1 为 CUR、CURNPs、CD-G5、 β -CD 的 FTIR 谱图。

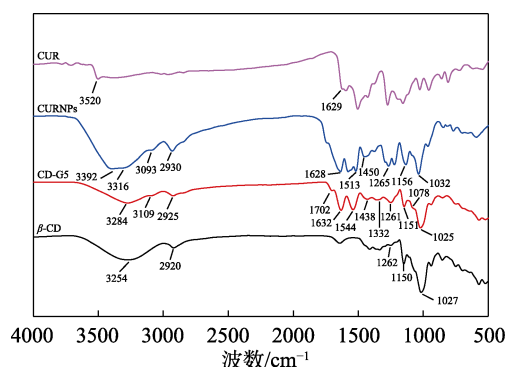


图 1 CUR、CURNPs、CD-G5、 β -CD 的 FTIR 谱图
Fig. 1 FTIR spectra of CUR, CURNPs, CD-G5 and β -CD

从图 1 可以看出, 在 CD-G5 的 FTIR 谱图中, 3284 cm^{-1} 处为 PAMAM 上的 N—H 键的伸缩振动峰; 3109 cm^{-1} 处为 β -CD 上的 O—H 键的伸缩振动峰; 2925 cm^{-1} 处为饱和碳原子上的 C—H 键的伸缩振动峰; 1702 和 1632 cm^{-1} 处为 C=O 键的伸缩振动峰; 1544 cm^{-1} 处为酰胺 N—H 键的弯曲振动峰; 1438 cm^{-1} 处为 C—H 键的弯曲振动峰; 1332 cm^{-1} 处为 C—N 键的伸缩振动峰; 1261 、 1151 、 1078 和 1025 cm^{-1} 处为 C—O—C 和 C—O 键的伸缩振动峰。与 β -CD 的 FTIR 谱图相比, CD-G5 在 1702 和 1544 cm^{-1} 处出现对应于 C=O 键和 N—H 键的新峰。结合 ^1H NMR 数据表明, β -CD 成功修饰在 PAMAM G5.0 表面, 得到纳米载体 CD-G5。

从图 1 还可以看出, CUR 的 FTIR 谱图中, 3520 cm^{-1} 处峰是由苯环上的—OH 拉伸引起的; 1629 cm^{-1} 处为 C=O 和 C=C 键的伸缩振动峰。CURNPs 的 FTIR 谱图中, 3392 cm^{-1} 处为分子内缔合 O—H 的伸缩振动峰; 3316 cm^{-1} 处为 PAMAM 上 N—H 键的伸缩振动峰; 3093 cm^{-1} 处为芳环上 C—H 键的伸缩振动峰; 2930 cm^{-1} 处为饱和碳原子上的 C—H 键的伸缩振动峰; 1628 cm^{-1} 处为 C=O 键的伸缩振动峰; 1513 cm^{-1} 处为酰胺 N—H 键的弯曲振动峰; 1450 cm^{-1} 处为 C—N 键的弯曲振动峰; 1265 、 1156 和 1032 cm^{-1} 处为 C—O—C 键的伸缩振动峰; CURNPs 在 3520 cm^{-1} 处的 O—H 峰消失, 3392 cm^{-1} 处的分子内缔合 O—H 特征峰加强, 在 1628 cm^{-1} 处可以看到与 CUR 有关的吸收峰。

图 2 为 CUR 和 CURNPs 的 UV-Vis 吸收谱图。从图 2 可以看出, CUR 在 431 nm 处有特征吸收峰, CURNPs 在 432 nm 处有特征吸收峰。结合 FTIR 表征 (图 1), 表明 CUR 成功负载在 CD-G5 上。

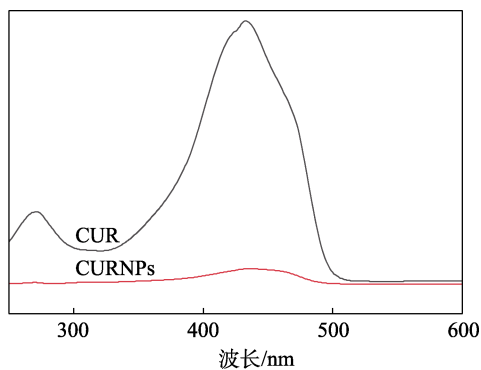


图 2 CUR 和 CURNPs 的 UV-Vis 吸收光谱
Fig. 2 UV-Vis adsorption spectra of CUR and CURNPs

图 3 为 CURNPs 和 MM@CURNPs 的 TEM 图和粒径分布图。

从图 3 可以看出, CURNPs 纳米粒子呈圆球形, 且形状规则 (图 3a), 其平均粒径为 148.3 nm , 聚合物分散性指数 (PDI) 为 0.127 (图 3c), 表明 CURNPs 粒子具有良好的尺寸和分散性。

从图 3 还可以看出, MM@CURNPs 纳米粒子呈圆球形, 且形状规则, 具有深色中心和外层暗膜 (图 3b)。其平均粒径为 162.2 nm , PDI 为 0.103 (图 3d), 表明粒子分散性良好。MM 厚度约 7 nm ^[32], MM@CURNPs 较 CURNPs 粒径增大了 13.9 nm , 表明 MM 包覆在 CURNPs 表面, 增大了 MM@CURNPs 的粒径。图 3b 中 MM@CURNPs 外层暗膜就是 MM。以上结果表明, MM 成功包覆了纳米粒子 CURNPs。

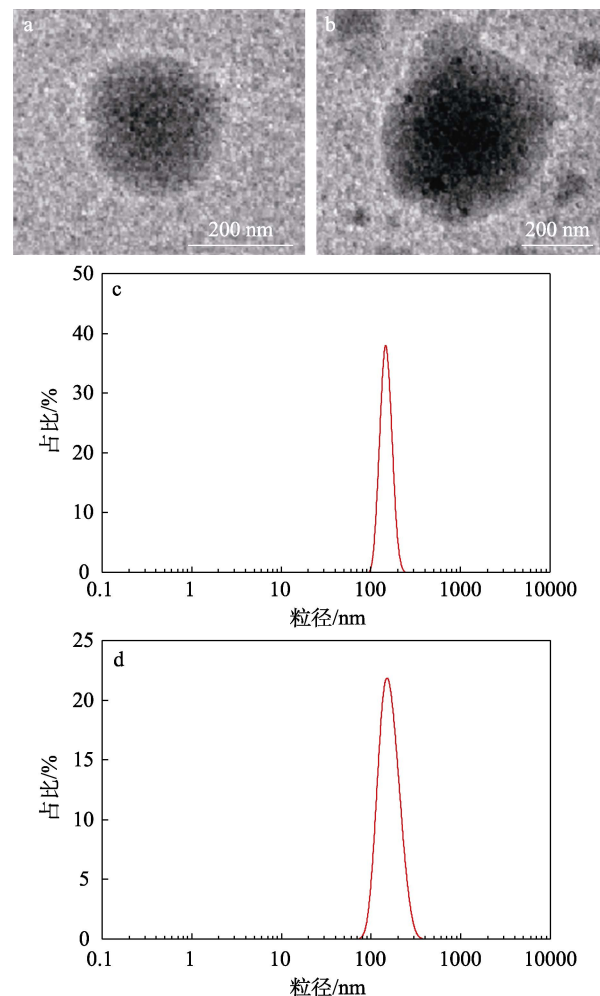


图 3 CURNPs (a) 和 MM@CURNPs (b) 的 TEM 图; CURNPs (c) 和 MM@CURNPs (d) 的粒径分布曲线

Fig. 3 TEM images of CURNPs (a) and MM@CURNPs (b); Particle size distribution curves of CURNPs (c) and MM@CURNPs (d)

图 4 为 MM@CURNPs 的平均粒径随时间的变化图。

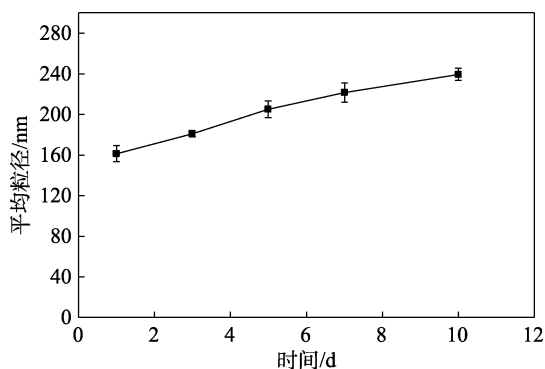


图4 MM@CURNPs的平均粒径随时间的变化

Fig. 4 Change of average particle size of MM@CURNPs over time

从图4可以看出,MM@CURNPs放置10 d内,其平均粒径随存放时间的增加而增大;放置1 d时平均粒径最小,为162.2 nm;放置10 d时,平均粒径最大,为238.6 nm。虽然纳米粒子平均粒径随时间的推移而增大,但是增幅较小,MM@CURNPs始终保持着较好的纳米尺寸。表明制备的MM@CURNPs纳米粒子具有一定的储存稳定性。

2.2 载药与释药性能分析

2.2.1 纳米粒子载药性

经测定,CURNPs样品溶液在431 nm处的吸光度为0.242,根据CUR溶液标准曲线方程计算出质量浓度为20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 样品溶液中CUR质量浓度为1.919 $\mu\text{g}/\text{mL}$,根据式(1)和(2)计算出CURNPs载药率为9.60%,包封率为42.48%。这是因为,PAMAM和 $\beta\text{-CD}$ 为CURNPs纳米载体提供了疏水载药空腔,赋予药物良好的载药性能,因此,制备的纳米载体具备较好的CUR负载能力和包封效率。

2.2.2 纳米粒子释药性

图5为CURNPs和MM@CURNPs体外释药曲线。

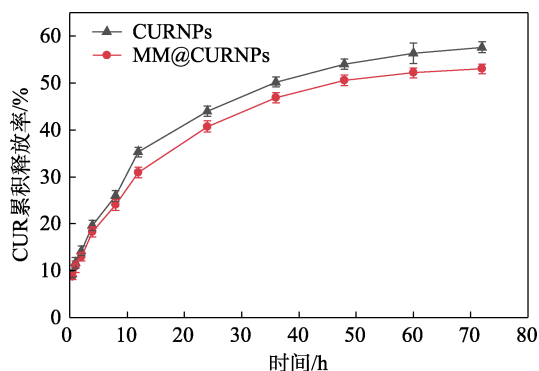


图5 CURNPs和MM@CURNPs体外释药曲线

Fig. 5 *In vitro* release profiles of CURNPs and MM@CURNPs

从图5可以看出,CURNPs和MM@CURNPs都呈现出药物缓释行为;前12 h内,纳米载药粒子的药物累积释放量都<35%;药物释放72 h后,累积释放量都达到约50%,而MM@CURNPs药物释放速度更为缓慢,原因是其表面包覆的MM对药物释放有一定的阻碍作用。因此,MM@CURNPs具有更好的药物缓释作用,有助于载药纳米粒子在体内的长效药物释放。

2.3 CURNPs体外生物活性分析

2.3.1 体外细胞毒性分析

图6为Raw 264.7细胞在不同浓度PAMAM G5.0、CURNPs和MM@CURNPs中的细胞活性。

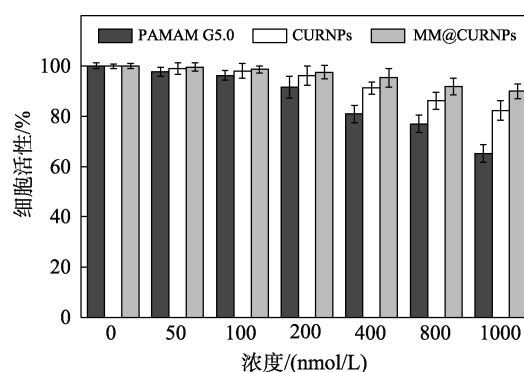


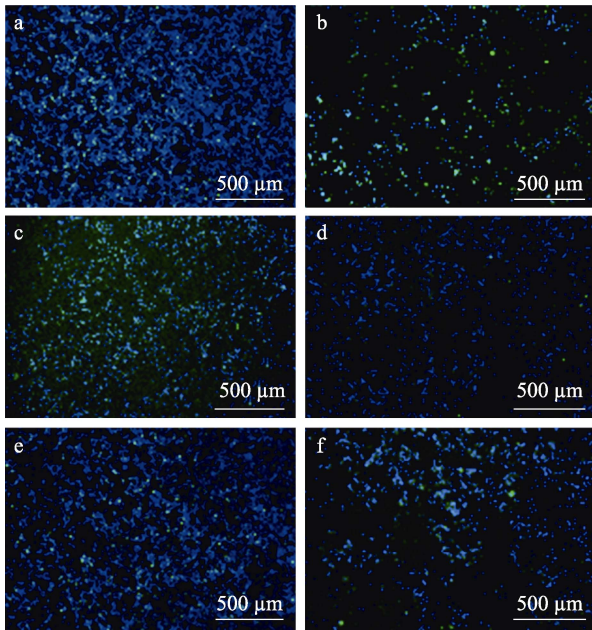
图6 Raw 264.7细胞在不同浓度PAMAM G5.0、CURNPs、MM@CURNPs中的细胞活性

Fig. 6 Cellular activity of Raw 264.7 cells in PAMAM G5.0, CURNPs and MM@CURNPs at different concentrations

从图6可以看出,当纳米粒子浓度 ≤ 200 nmol/L时,所有实验组的细胞存活率均>90%;随着纳米离子浓度的进一步增大,各组细胞活性均有所下降,尤其是PAMAM G5.0实验组降幅最为显著,其次是CURNPs实验组。MM@CURNPs实验组的细胞活性在所有实验质量浓度下都保持最高,当纳米粒子浓度为1000 nmol/L时,PAMAM G5.0实验组细胞活性降至65%,CURNPs实验组的细胞活性降至82%,MM@CURNPs实验组的细胞活性仍保持在90%,说明MM@CURNPs对细胞毒性最小。这是因为,PAMAM G5.0表面的氨基含量较高,会对细胞产生一定毒性, $\beta\text{-CD}$ 修饰可以使PAMAM毒性得到一定程度的降低^[33],使用内源性膜MM包覆后毒性进一步降低。因此,MM@CURNPs仿生纳米粒子对细胞毒性较小,具有较高的生物安全性。

2.3.2 巨噬细胞摄取分析

图7为CURNPs-FITC和MM@CURNPs-FITC不同时间的巨噬细胞摄取情况。



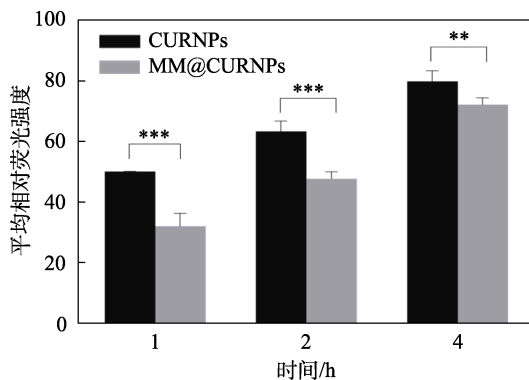
a、d—1 h; b、e—2 h; c、f—4 h

图 7 CURNPs-FITC (a~c) 和 MM@CURNPs-FITC (d~f) 不同时间的巨噬细胞摄取荧光图

Fig. 7 Macrophage uptake fluorograms of CURNPs-FITC (a~c) and MM@CURNPs-FITC (d~f)

从图 7 可以看出,随着时间的增长,绿色荧光(被 FITC 荧光标记的 CURNPs 和 MM@CURNPs)出现聚集,表示巨噬细胞(染色后为蓝色荧光)对纳米粒子的摄取,在相同时间下,CURNPs-FITC 组的平均荧光强度均强于 MM@CURNPs-FITC 组。

图 8 为巨噬细胞摄取 CURNPs-FITC 和 MM@CURNPs-FITC 荧光图的平均荧光强度定量分析结果。



样品量 $n=4$; “*”表示差异显著 ($P<0.05$); “**”表示差异非常显著 ($P<0.01$); “***”表示差异极其显著 ($P<0.001$)

图 8 CURNPs-FITC 和 MM@CURNPs-FITC 的巨噬细胞摄取荧光定量分析

Fig. 8 Quantitative fluorescence analysis of macrophage uptake of CURNPs-FITC and MM@CURNPs-FITC

从图 8 可以看出,随时间的推移,巨噬细胞持续对 CURNPs-FITC 和 MM@CURNPs-FITC 进行摄取,平均荧光强度增强。在相同时间下,巨噬细胞

对 MM@CURNPs-FITC 的摄取少于对 CURNPs-FITC 的摄取,两组之间平均荧光强度存在显著差异。其中,4 h 时,巨噬细胞对 MM@CURNPs-FITC 摄取的平均荧光强度为 72,巨噬细胞对 CURNPs-FITC 摄取的平均荧光强度为 80。表明 MM 包覆的仿生纳米粒子 MM@CURNPs 可以减少被巨噬细胞的吞噬,具有免疫逃逸功能。这是因为,巨噬细胞是体内主要的免疫细胞,MM 上保留有巨噬细胞固有膜蛋白和功能^[34],可以帮助 MM 仿生纳米颗粒伪装成宿主细胞,有效逃避免疫系统的清除,延长血液循环时间。

3 结论

制备了一种纳米仿生载药系统 MM@CURNPs,该粒子具有良好的纳米尺寸(162.2 nm)和粒径分散性(PDI=0.103),以及较好的粒子稳定性(1 d 时平均粒径最小,为 162.2 nm;10 d 时平均粒径最大,为 238.6 nm),载药性能(CURNPs 载药率为 9.60%)和药物缓释性能(药物 72 h 累积释放量约 50%)良好,且具有生物安全性(1000 nmol/L 的 MM@CURNPs 溶液中的 Raw 264.7 细胞活性保持在 90%)和巨噬细胞免疫逃逸功能,有望帮助实现纳米载药系统在体内的长效循环。

本文制备的 MM@CURNPs 对于动脉粥样硬化治疗的研究具有参考价值。

参考文献:

- [1] World Health Organization. World health statistics 2023: Monitoring health for the SDGs, sustainable development goals[R]. Geneva: WHO, 2023.
- [2] VIRANI S S, ALONSO A, APARICIO H J, *et al.* Heart disease and stroke statistics-2021 update[J]. *Circulation*, 2021, 143(8): e254-e743.
- [3] ZHANG L W, XUE S, REN F, *et al.* An atherosclerotic plaque-targeted single-chain antibody for MR/NIR-II imaging of atherosclerosis and anti-atherosclerosis therapy[J]. *Journal of Nanobiotechnology*, 2021, 19(1): 296.
- [4] POPA-FOTEAN M, FERDOSCHI C E, MICHEU M M. Molecular and cellular mechanisms of inflammation in atherosclerosis[J]. *Frontiers in Cardiovascular Medicine*, 2023, 10: 1200341.
- [5] HAN Y M, LEE Y J, JANG Y N, *et al.* Aspirin improves nonalcoholic fatty liver disease and atherosclerosis through regulation of the PPAR δ -AMPK-PGC-1 α pathway in dyslipidemic conditions[J]. *BioMed Research International*, 2020, 2020(9): 1-17.
- [6] CHOUDHARY A, RAWAT U, KUMAR P, *et al.* Pleiotropic effects of statins: The dilemma of wider utilization of statin[J]. *The Egyptian Heart Journal*, 2023, 75(1): 1-10.
- [7] KORANI S, KORANI M, BAHRAMI S, *et al.* Application of nanotechnology to improve the therapeutic benefits of statins[J]. *Drug Discovery Today*, 2019, 24(2): 567-574.
- [8] WANG D, WANG X L. Diosgenin and its analogs: Potential protective agents against atherosclerosis[J]. *Drug Design, Development and Therapy*, 2022, 16: 2305-2323.
- [9] MORIYA J. Critical roles of inflammation in atherosclerosis[J]. *Journal of Cardiology*, 2019, 73(1): 22-27.
- [10] SUN D, CHEN J, WANG Y, *et al.* Advances in refunctionalization of erythrocyte-based nanomedicine for enhancing cancer-targeted drug delivery[J]. *Theranostics*, 2019, 9(23): 6885-6900.
- [11] NETTERSHEIM F S, de VORE L, WINKELS H. Vaccination in

- Atherosclerosis[J]. *Cells*, 2020, 9(12): 2560.
- [12] SHARMA S, SHARMA J B, BHATT S, *et al.* Method development and validation of UV spectrophotometric method for the quantitative estimation of curcumin in simulated nasal fluid[J]. *Drug Research*, 2020, 70(8): 356-359.
- [13] ZHOU G Y (周国永), YIN F L (尹付琳), YIN C W (尹城武), *et al.* Preparation and drug sustained-release properties of PEGMA-*b*-PCL with low critical micelle concentration[J]. *Fine Chemicals (精细化工)*, 2024, 41(6): 1318-1327.
- [14] LIN K, CHEN H J, CHEN X J, *et al.* Efficacy of curcumin on aortic atherosclerosis: A systematic review and meta-analysis in mouse studies and insights into possible mechanisms[J]. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2020, 2020: 1-16.
- [15] WANG M N (王梦楠), QIN H W (秦合伟), GUO N (郭宁), *et al.* Mechanism of action and research progress of curcumin against atherosclerosis[J]. *Acta Chinese Medicine and Pharmacology (中医药学报)*, 2022, 50(7): 116-120.
- [16] MENG N, GONG Y, ZHANG J F, *et al.* A novel curcumin-loaded nanoparticle restricts atherosclerosis development and promotes stability in apolipoprotein E deficient mice[J]. *Journal of Biomaterials Applications*, 2019, 33(7): 946-954.
- [17] KOU L F, BHUTIA Y D, YAO Q, *et al.* Transporter-guided delivery of nanoparticles to improve drug permeation across cellular barriers and drug exposure to selective cell types[J]. *Frontiers in Pharmacology*, 2018, 9: 27.
- [18] GE J F (葛界芳), XIONG X Y (熊向源). Nanoscale drug delivery systems for multidrug resistance inhibition in cancer therapy[J]. *Fine Chemicals (精细化工)*, 2023, 40(5): 889-999.
- [19] LI R X, HE Y W, ZHANG S Y, *et al.* Cell membrane-based nanoparticles: A new biomimetic platform for tumor diagnosis and treatment[J]. *Acta Pharmaceutica Sinica B*, 2018, 8(1): 14-22.
- [20] LIAO Y Y, ZHANG Y F, BLUM N T, *et al.* Biomimetic hybrid membrane-based nanoplatfoms: Synthesis, properties and biomedical applications[J]. *Nanoscale Horizons*, 2020, 5(9): 1293-1302.
- [21] LEE N H, YOU S, TAGHIZADEH A, *et al.* Cell membrane-cloaked nanotherapeutics for targeted drug delivery[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2022, 23(4): 2223.
- [22] LOPES J, LOPES D, PEREIRA-SILVA M, *et al.* Macrophage cell membrane-cloaked nanoplatfoms for biomedical applications[J]. *Small Methods*, 2022, 6(8): 2200289.
- [23] LI M T, FANG H Y, LIU Q Y, *et al.* Red blood cell membrane-coated upconversion nanoparticles for pretargeted multimodality imaging of triple-negative breast cancer[J]. *Biomaterials Science*, 2020, 8(7): 1802-1814.
- [24] EZEH C K, DIBUA M E U. Anti-biofilm, drug delivery and cytotoxicity properties of dendrimers[J]. *Admet Dmpk*, 2024, 12(2): 239-267.
- [25] PEDZIWIATR-WERBICKA E, MILOWSKA K, DZMITRUK V, *et al.* Dendrimers and hyperbranched structures for biomedical applications[J]. *European Polymer Journal*, 2019, 119: 61-73.
- [26] DEY A D, BIGHAM A, ESMAEILI Y, *et al.* Dendrimers as nanoscale vectors: Unlocking the bars of cancer therapy[J]. *Seminars in Cancer Biology*, 2022, 86: 396-419.
- [27] FICKER M, THEEUWEN M J M, JANASZEWSKA A, *et al.* Complexes of indomethacin with 4-carbomethoxy-pyrrolidone PAMAM dendrimers show improved anti-inflammatory properties and temperature-dependent binding and release profile[J]. *Molecular Pharmaceutics*, 2018, 15(8): 3573-3582.
- [28] YI S H, ZHENG J N, LYU P, *et al.* Controlled drug release from cyclodextrin-gated mesoporous silica nanoparticles based on switchable host-guest interactions[J]. *Bioconjugate Chemistry*, 2018, 29(9): 2884-2891.
- [29] GANDHI S, SHENDE P. Cyclodextrins-modified metallic nanoparticles for effective cancer therapy[J]. *Journal of Controlled Release*, 2021, 339: 41-50.
- [30] HU Y, XING K Q, LI X J, *et al.* Cyclodextrin carboxylate improves the stability and activity of nisin in a wider range of application conditions[J]. *Npj Science of Food*, 2023, 7(1): 20.
- [31] HUO M M, LI W Y, CHAUDHURI A S, *et al.* Bio-stimuli-responsive multi-scale hyaluronic acid nanoparticles for deepened tumor penetration and enhanced therapy[J]. *Carbohydrate Polymers*, 2017, 171: 173-182.
- [32] WANG P (王鹏). Preparation of macrophage membrane coated drug-loaded PLGA nanoparticles and experimental study on targeting of CT26 cells[D]. Wuhan: Huazhong University of Science and Technology (华中科技大学), 2019.
- [33] YANG J P, ZHANG Q, CHANG H, *et al.* Surface-engineered dendrimers in gene delivery[J]. *Chemical Reviews*, 2015, 115(11): 5274-5300.
- [34] SHA X, DAI Y, CHONG L J, *et al.* Pro-effferocytic macrophage membrane biomimetic nanoparticles for the synergistic treatment of atherosclerosis via competition effect[J]. *Journal of Nanobiotechnology*, 2022, 20(1): 506.

(上接第 500 页)

- [20] LI X R (李小瑞), WANG H H (王海花), FEI G Q (费贵强). Structure and properties of cationic polyurethane/polydimethylsiloxane surfactant-free micro emulsion membranes[J]. *Fine Chemicals (精细化工)*, 2005, 22(12): 937-942.
- [21] BAO L H (鲍利红), LI Y (李英). Synthesis and properties of siloxane-modified polyurethane coating for synthetic leather[J]. *Fine Chemicals (精细化工)*, 2009, 26(7): 697-701.
- [22] LYU B (吕斌), ZHANG H N (张鹤年), GAO D G (高党鸽). Preparation and antifouling performance of castor oil based waterborne polyurethane modified by PDMS[J]. *Fine Chemicals (精细化工)*, 2022, 39(3): 541-547.
- [23] WEI D D (韦代东), LI H Z (李惠枝), ZENG J J (曾娟娟), *et al.* Preparation and performance of biobased polyurethane anti-graffiti and self-cleaning coating[J]. *China Plastics (中国塑料)*, 2023, 37(2): 15-21.
- [24] SAALAH S, ABDULLAH L C, AUNG M M, *et al.* Physicochemical properties of jatropha oil-based polyol produced by a two steps method[J]. *Molecules*, 2017, 22(4): 551.
- [25] JIN Y (靳尧). Study on waterborne polyurethane modified with short fluoroalkyl compounds and its coating properties[D]. Tianjin: Hebei University of Technology (河北工业大学), 2022.
- [26] ZHANG J S (张晶书), ZHANG Y (张扬), LI H (李珩), *et al.* Effect of treatment temperature on properties of silicone modified waterborne polyurethane films[J]. *Polyurethane Industry (聚氨酯工业)*, 2018, 33(5): 37-40.
- [27] LI J W, HONG C Y, ZHANG J Q, *et al.* Novel multifunctional highly crosslinked bio-based waterborne polyurethane networks modified via long fatty hydrophobic side chains[J]. *Progress in Organic Coatings*, 2024, 189: 108340.
- [28] ZHENG G K, LU M, RUI X P. The effect of polyether functional polydimethylsiloxane on surface and thermal properties of waterborne polyurethane[J]. *Applied Surface Science*, 2017, 399: 272-281.
- [29] KIM E J, PAIK I K, PARK J H, *et al.* Low-temperature flexible WPU-PDMS copolymers for cold-resistant coating applications[J]. *Fibers and Polymers*, 2023, 24(6): 1919-1928.
- [30] LI J W, HONG C Y, ZHANG J Q, *et al.* Novel multifunctional highly crosslinked bio-based waterborne polyurethane networks modified via long fatty hydrophobic side chains[J]. *Progress in Organic Coatings*, 2024, 189: 108340.
- [31] LI M Y, WEI D D, ZHANG W C, *et al.* Development of biobased polyol from epoxidized soybean oil for polyurethane anti-smudge coatings[J]. *Journal of Applied Polymer Science*, 2022, 139(44): e53101.
- [32] LIANG Y, ZHANG D, ZHOU M Y, *et al.* Bio-based omniphobic polyurethane coating providing anti-smudge and anti-corrosion protection[J]. *Progress in Organic Coatings*, 2020, 148: 105844.