

靶向动脉粥样硬化病灶的细胞膜仿生递药系统的初步研究

程立婷, 李 翀*

(西南大学药学院, 重庆 400716)

摘要: 基于巨噬细胞与动脉粥样硬化病灶之间的天然亲和性, 本文拟构建一种新型的巨噬细胞膜包裹聚乳酸-羟基乙酸共聚物 (PLGA) 纳米粒 (macrophage-membrane-coated PLGA nanoparticles, MPLNPs) 仿生递药系统, 并对其靶向动脉粥样硬化病灶的功能进行初步评价。采用沉淀法制备 PLGA 纳米粒 (PLGANPs) 及纳米膜挤压法制备 MPLNPs, 对其形态、粒径及携带功能蛋白进行表征; 进一步通过体外细胞模型摄取和动物模型体内荧光成像考察其靶向性。结果表明, MPLNPs 呈球形, 具有明显的核/壳结构, 平均粒径为 (167 ± 6.12) nm, 表面保留了整合素 $\alpha 4\beta 1$ (integrin $\alpha 4\beta 1$, $\alpha 4\beta 1$); 用脂多糖 (LPS) 诱导建立的人脐静脉内皮细胞 (HUVEC) 损伤模型及用 $ApoE^{-/-}$ (载脂蛋白 E 敲除) 小鼠建立的动脉粥样硬化模型血管损伤处均高表达血管细胞黏附分子-1 (VCAM-1) 受体, 制备的 MPLNPs 能有效识别 VCAM-1 受体并呈现出良好的体内外靶向性。本研究探索制备的细胞膜仿生纳米载体, 有望为动脉粥样硬化及相关疾病治疗提供新思路。

关键词: 动脉粥样硬化; 血管细胞黏附分子-1; 巨噬细胞膜; 整合素 $\alpha 4\beta 1$

中图分类号: R943

文献标识码: A

文章编号: 0513-4870 (2018) 02-0297-07

A preliminary study on the biomimetic drug delivery system targeting atherosclerotic lesions

CHENG Li-ting, LI Chong*

(College of Pharmaceutical Sciences, Southwest University, Chongqing 400716, China)

Abstract: Based on the natural affinity between macrophages and atherosclerotic lesions, we made a novel macrophage membrane-coated polylactic acid-glycolic acid copolymer (PLGA) nanoparticle (MPLNPs), and examined its ability targeting atherosclerotic lesions. PLGA nanoparticle (PLGANPs) were prepared by precipitation and MPLNPs were prepared by membrane extrusion. Their morphology, particle size and retainment of functional proteins were characterized. Their targeting capabilities were investigated with cell uptake assay *in vitro* and fluorescence imaging *in vivo*. The results showed that MPLNPs were spherical, with obvious core/shell structure, the average particle size was (167 ± 6.12) nm, and integrin $\alpha 4\beta 1$ was retained on the surface. Vascular cell adhesion molecule 1 (VCAM-1) receptor was highly expressed in the LPS (lipopolysaccharides)-HUVEC (human umbilical vein endothelial cells) and atherosclerotic lesions in $ApoE^{-/-}$ mouse model, and the nanoparticles could effectively recognize the VCAM-1 receptor and had good targeting properties *in vitro* and *in vivo*. The results suggest that the cell membrane biomimetic nano-carrier may provide a new approach for the targeting strategy in the treatment of atherosclerosis and related diseases.

Key words: atherosclerosis; vascular cell adhesion molecule 1; macrophage membrane; integrin $\alpha 4\beta 1$

收稿日期: 2017-10-13; 修回日期: 2017-11-14.

基金项目: 重庆市基础科学与前沿技术研究专项项目 (cstc2015jcyjBX0100).

*通讯作者 Tel / Fax: 86-23-68251225, E-mail: chongli2009@gmail.com

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2017-0999

动脉粥样硬化 (atherosclerosis, AS) 是一种严重危害人类健康的常见病, 是冠心病、脑梗死和外周血管病等缺血性心脑血管病的主要病理基础^[1]。迄今为止, AS 的发病机制尚未完全阐明, 存在多种学说, 其中炎症学说是最受认可的学说之一。该学说认为各种危险因素造成的动脉内膜损伤是动脉粥样硬化的始动环节。在这一过程中, 活化的血管内皮细胞分泌一些黏附分子, 如血管细胞黏附分子-1 (vascular cell adhesion molecule-1, VCAM-1)、细胞间黏附分子-1 (inter cellular adhesion molecule-1, ICAM-1) 等。这些黏附分子介导了内皮细胞与白细胞、血小板间的起始黏附, 促进单核细胞在组织中的游走, 增加与细胞间的相互作用, 促使病损进一步发展, 最终形成动脉粥样硬化斑块^[2-5]。

研究表明, 巨噬细胞参与了动脉粥样硬化病理进程中的多个重要环节。在 AS 起始过程中, 巨噬细胞集落刺激因子 (macrophage colony stimulating factor) 以及其他的分化因子驱使单核细胞分化成巨噬细胞; 而在 AS 发展进程中, 巨噬细胞促进斑块的形成、稀释纤维帽和坏死核心成分, 由此导致炎症应答的增加和斑块内白细胞等凋亡信号的增强。在 AS 病理进程中, 巨噬细胞膜表面蛋白发挥着重要作用。研究表明, 巨噬细胞表面已知的蛋白大概有 1 000 多种, 其中有 458 种是经基因本体注释 (the gene ontology annotation) 的膜蛋白, 包括 CD11b、CD14、CD18、CD40、CD86、CD44 和 CD16 等^[6], 这些蛋白功能各异。如 CD40 可以通过与可溶性 CD40 配体结合, 调节多种细胞因子、趋化因子、黏附分子和生长因子等表达, 促进 AS 相关炎症、免疫反应, 诱导 AS 斑块发生进展, 增加斑块的易损性^[7]; C-反应蛋白 (C-reactive protein) 可以促进 VCAM-1、ICAM-1、E-选择素及单核细胞趋化蛋白 (monocytes chemoattractant protein-1) 表达, 促进炎症反应的发生, 是 AS 发展中的重要炎症标志物^[8]。

近年来, 应用细胞膜包裹纳米粒这一仿生策略在多种疾病的靶向递药研究中取得较大进展^[9,10]。细胞膜包裹纳米粒是将细胞膜包覆在纳米颗粒表面所制备而成的一种新型药物递送载体和仿生纳米材料, 将细胞膜与纳米粒结合, 不仅能增加纳米粒的生物相容性, 还可以通过选择不同种类细胞的细胞膜, 如血细胞、干细胞或细菌细胞等, 使得纳米粒“穿衣”后获得原细胞的部分功能。文献^[11-14]报道, 巨噬细胞膜包裹的仿生纳米递药系统, 已被用于构建靶向肺转移乳腺癌的仿生递药系统, 体现出用于病灶精准

治疗的良好潜力。本研究拟设计一种以巨噬细胞膜包裹的纳米粒作为药物载体, 通过巨噬细胞膜上整合素 $\alpha 4\beta 1$ 与动脉粥样硬化血管黏附分子 VCAM-1 的特异性识别, 实现在动脉粥样硬化病灶部位的高度蓄积。

材料与方法

药品与试剂 胰酶、DMEM、RPMI1640、胎牛血清 (Gibco 公司); 尼罗红 (Nile)、DiR 碘化物 (DiR) (阿拉丁试剂有限公司); 四甲基噻唑蓝 (MTT)、脂多糖 (LPS) (Sigma 公司); $\alpha 4$ 、 $\beta 1$ 、VCAM-1 等一抗及相应的二抗 (Proteintech 公司); 血清总胆固醇 (TC) 检测试剂盒、甘油三酯 (TG) 检测试剂盒、BCA 蛋白定量试剂盒 (碧云天公司)。

细胞与动物 RAW264.7 巨噬细胞 (RAW264.7)、人脐静脉内皮细胞 (HUVEC) 购自中国科学院细胞库。ApoE^{-/-}小鼠及 C57BL/6 小鼠, SPF 级, 雄性, 6 周龄, 北京华阜康生物科技股份有限公司提供, 生产许可证号: SCXK (京) 2014-0004。

主要仪器 激光粒度及 zeta 电位分析仪 (Nano ZS, 英国马尔文公司); FEI Tecnai G20 高分辨透射电镜 (美国 FEI 公司); BLO-RAD MODEL 680 酶标仪 (北京成志科为生物科技有限公司); 荧光倒置显微镜 (IX-73, 日本奥林巴斯公司); NovoCyte 流式细胞仪 (艾森生物有限公司); 小动物活体成像系统 (IVIS lumina II, 美国 PerkinElmer 公司); Nikon Eclipse E100 正置光学显微镜 (日本尼康公司)。

细胞培养 RAW264.7 和 HUVEC 细胞培养于 37 °C、5% CO₂ 中。RAW264.7 用含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基培养 (含双抗), HUVEC 细胞用含 10% 胎牛血清的 RPMI1640 培养基培养 (含双抗)。取对数生长期的 RAW264.7 和 HUVEC 细胞进行实验, 96 孔板和 24 孔板接种细胞数分别为 1×10⁴ 和 5×10⁴ 个/孔, 培养过夜。

巨噬细胞膜仿生纳米载体的制备与表征

巨噬细胞膜的提取 参考 Cao 等^[15]的制备方法。收集巨噬细胞, 加入 4 °C TM buffer (pH 7.4, 0.01 mol·L⁻¹ Tris 和 0.001 mol·L⁻¹ MgCl₂) 重悬, 调整细胞数为每毫升 2.5×10⁷ 个, 用微型均质机来回挤压破碎细胞膜 (20 次), 加入适量 1 mol·L⁻¹ 蔗糖与细胞匀浆混合, 使蔗糖终浓度为 0.25 mol·L⁻¹。接着进行如下操作: ① 4 °C, 2000 ×g 离心 10 min, 取上清液; ② 4 °C, 3000 ×g 离心 30 min, 弃去上清液; ③ 加入 4 °C 含 0.25 mol·L⁻¹ 蔗糖 TM buffer 重悬, 4 °C, 3000 ×g 离

心 30 min, 弃去上清液。管底沉淀物即为巨噬细胞膜, 用 BCA 蛋白定量试剂盒测定细胞膜蛋白含量, -20°C 保存。

纳米粒的制备 采用沉淀法制备聚乳酸-羟基乙酸共聚物 (PLGA) 空白纳米粒, 精密称定 PLGA 10 mg, 丙酮 1 mL 溶解, 搅拌下逐滴注入纯水中, 继续搅拌 2 h, 30°C 减压旋转蒸发 1 h 至丙酮完全除去, 得到空白纳米粒 (PLGANPs), 4°C 保存。荧光素标记纳米粒的制备过程与空白纳米粒类似, 取上述溶解后的 PLGA 1 mL, 精密吸取 $1\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 相应的荧光素 (Nile、DiR) 溶液 10 μL , 充分混匀后按照上述方法制备得到荧光素标记的纳米粒, 4°C 保存^[16]。

巨噬细胞膜仿生纳米载体的制备与表征 采用纳米膜挤压法^[17], 将巨噬细胞膜用微型均质机反复挤压, 制成巨噬细胞膜囊泡。然后以 0.28 mg 蛋白含量的巨噬细胞膜囊泡与 PLGANPs ($1\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) 0.5 mL 混合, 依次通过 400、200 nm 的聚碳酸酯 (PC) 滤膜反复挤压制成巨噬细胞膜纳米载体 (MPLNPs)。用激光散射粒度仪测定纳米粒的粒径及其分散情况, 并用透射电镜 (TEM) 观察纳米粒的外观形态。

人脐静脉内皮细胞炎症损伤模型建立的条件摸索 取对数生长期的 HUVEC 细胞, 以每孔每毫升 1×10^4 个接种于 96 孔板, 每孔加入 100 μL , 过夜贴壁; 吸出培养基, 加入无血清培养基饥饿 12 h, 分别给予不同浓度 LPS (终质量浓度为 0、1.56、3.125、6.25、12.5、25、50、100 和 200 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$), 每组 3 个复孔, 置于 CO_2 培养箱中继续培养; 24 h 后每孔加入 MTT 溶液 ($5\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$) 20 μL , 4 h 后每孔加入二甲基亚砷 150 μL , 37°C 振荡 30 min 后用酶标仪在 490 nm 波长处测定吸光度 (A) 值。

$\alpha 4\beta 1$ 及 VCAM-1 蛋白表达检测 收集各组细胞, 加入细胞裂解液提取总蛋白。按照 BCA 蛋白定量试剂盒使用说明操作, 测定蛋白浓度。分别取蛋白 60 μg 加入蛋白上样缓冲液, 煮沸 10 min; 10% 聚丙烯酰胺-SDS 凝胶电泳后, 电转移至 PVDF 膜上, 5% 脱脂奶粉封闭后依次加入一抗和二抗, 室温孵育 2 h; TBST 缓冲液洗涤 5 次, 每次 10 min, 凝胶成像系统获取图像。

细胞摄取实验 将 HUVEC 细胞接种于 24 孔板中, 培养过夜后, 分别以包载荧光素 Nile 的 PLGANPs、MPLNPs 及 blocked MPLNPs (即用特异性抗整联蛋白 $\alpha 4\beta 1$ 单克隆抗体封闭后的 MPLNPs), 避光条件下加入各孔中, 每组 8 孔; 避光培养 2 h 后, 弃去培养基, PBS 洗 3 次。同组实验中前 4 孔用 4% 多聚甲醛

在 37°C 固定 30 min, PBS 洗 3 次, DAPI 染色, PBS 洗 3 次, 荧光倒置显微镜下观察; 后 4 孔用胰酶溶液消化后, 直接以流式细胞仪测定 (Nile, 激发波长为 488 nm, 发射波长为 580 nm)。

动脉粥样硬化模型建立和评价 雄性 SPF 级 *ApoE*^{-/-} 基因敲除小鼠及 C57BL/6J 小鼠, 分别给予高脂饲料 (78% 基础饲料 + 21% 脂肪 + 1.25% 胆固醇) 喂养 12 周。取造模小鼠, 腹腔注射 3% 戊巴比妥钠 ($60\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$)。待小鼠麻醉后将其放至冰袋上并解剖开胸腔, 从左心室快速取血 0.8~1 mL, 迅速转移置 EP 管中, 4°C , $3500\times g$ 离心 15 min, 分离血浆, 4°C 冰箱保存备用。用预冷的 PB 缓冲液及 4% 多聚甲醛充分灌流后 (流速 $2\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$), 借助解剖显微镜、微型手术剪刀和镊子将胸主动脉取出 (从心脏根部开始至双侧髂动脉分支处)。小鼠的全身灌注及主动脉剥离均在冰上操作。

小鼠胸主动脉血管横截面 HE 染色 将分离出的胸主动脉血管用 OCT 包埋剂 (optimal cutting temperature compound, OCT) 包埋并于冰冻切片机 (-20°C) 切片, 自主动脉根部起行横截面冰冻连续切片, 切片厚度为 10 μm 。将主动脉切片于室温放置 30 min, 4% 多聚甲醛固定 5 min 后, 蒸馏水冲洗, 将切片浸入 Mayer 苏木素染液染色 5 min, 蒸馏水淋洗 2 次; 1% 盐酸酒精分化数秒, 蒸馏水冲洗; 0.6% 氨水返蓝, 蒸馏水冲洗; 伊红染液中染色 1 min, 蒸馏水浸泡 2~3 min; 之后将切片依次放入 80% 乙醇、90% 乙醇、95% 乙醇、无水乙醇 I、无水乙醇 II 各 30 s 脱水, 二甲苯 I、二甲苯 II 各 2 min 进行切片透明, 中性树胶封片。染色后的切片放置于 NIKON 显微镜下观察拍照。

小鼠血脂水平测定 取出 4°C 保存的血清, 用生化试剂盒测定血清中的总胆固醇 (TC)、甘油三酯 (TG)、低密度脂蛋白 (LDL-C) 和高密度脂蛋白 (HDL-C) 含量。

体内靶向性考察 将造模小鼠分为 3 组, 分别给予包载荧光探针 DiR 的 PLGANPs、MPLNPs 及 blocked MPLNPs 100 μL 。4 h 后腹腔注射 3% 戊巴比妥钠 ($60\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) 麻醉, 将胸主动脉取出, 用活体生物荧光成像技术检测制剂靶向性; 另取给予包载荧光探针 Nile 制剂的小鼠胸主动脉 OCT 包埋切片后进行免疫荧光共定位 (IF) 考察制剂靶向性。

免疫荧光共定位检测靶向性 将主动脉切片室温放置 30 min, 4% 多聚甲醛固定 5 min 后, PBS 洗涤 3 次, 每次 5 min; 3% 牛血清白蛋白 (BSA) 4°C 封闭

过夜,依次加入一抗和二抗,室温孵育 2 h, PBS 洗涤 3 次;滴加 DAPI,染色 5 min 后, PBS 洗涤 3 次;滴加 1 滴荧光淬灭封片剂于盖玻片中央,翻转载玻片放于盖玻片上,将载玻片置工作台上,用铝箔覆盖避光放置 30 min,使荧光淬灭封片剂凝结。显微镜下观察结果,并采用 Image-Pro Plus 6.0 计算荧光强度值,载玻片贮于-20℃。

统计学处理 数据用均数±标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,采用 SPSS 20.0 软件进行统计分析,以 $P < 0.01$ 表示有显著性差异。

结果与讨论

1 巨噬细胞膜仿生纳米载体的制备与表征

MPLNPs 的制备过程分为以下 3 个步骤:① PLGANPs 的制备;② 巨噬细胞膜的提取;③ 巨噬细胞膜包裹 PLGANPs。可见 PLGANPs (图 1A) 和 MPLNPs (图 1B) 的平均粒径均小于 150 nm,多分散指数 (PDI) 值分别为 0.128 和 0.149。表明本方法制得的纳米粒粒径大小适宜、分散性好。经透射电镜观察发现 PLGANPs (图 1C) 形态圆整、分布均匀;MPLNPs (图 1D) 具有明显的核/壳蛋黄状结构,与激光粒度仪检测结果一致。

2 相关功能蛋白的表达

研究表明,巨噬细胞可以通过膜上 $\alpha 4\beta 1$ 与 VCAM-1 结合。为了证实巨噬细胞膜和 MPLNPs 上

保留着 $\alpha 4\beta 1$, 本文通过 Western blot 检测 $\alpha 4\beta 1$ 在巨噬细胞膜及 MPLNPs 上的表达情况。结果显示, PLGANPs 上无明显蛋白表达 (图 2A), 而巨噬细胞、巨噬细胞膜及 MPLNPs 上均表达了 $\alpha 4\beta 1$ (图 2B)。

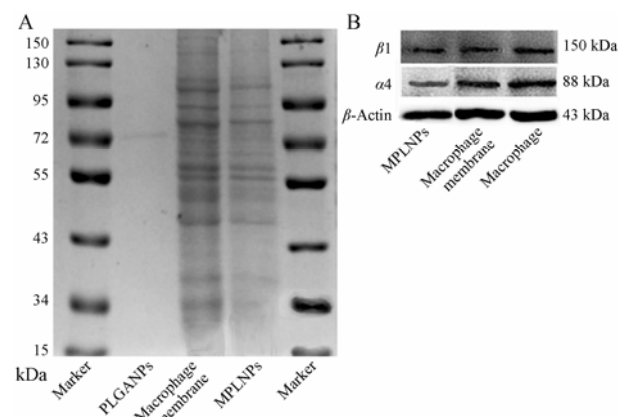


Figure 2 The protein expression of PLGANPs, MPLNPs, macrophage membranes and macrophage. A: Protein profiles in the PLGANPs, macrophage membrane, and MPLNPs determined by SDS-PAGE electrophoresis assay. B: Integrins $\alpha 4\beta 1$ in macrophage, macrophage membrane, and MPLNPs determined by Western blot assay. The protein signals of β -actin were performed as a control

3 人脐静脉内皮细胞损伤模型的建立及评价

HUVEC 人脐静脉内皮细胞株是常用的血管内皮细胞模型, LPS 诱导后其能高表达 VCAM-1 受体^[18,19]。本实验以 LPS 诱导建立人脐静脉内皮细胞损伤模型

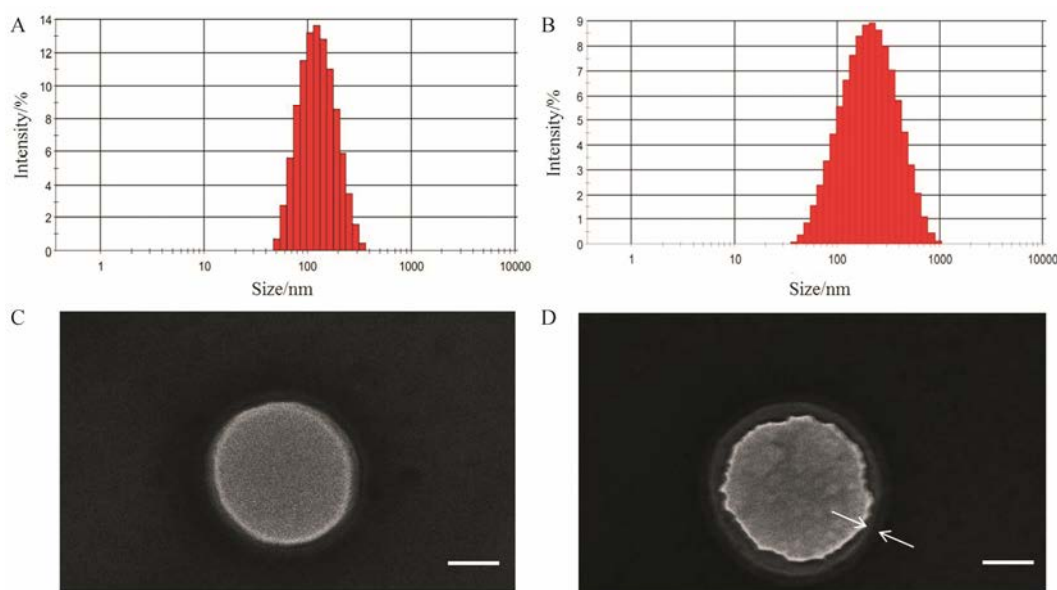


Figure 1 The characterization of nanoparticles (NPs). The particle size and distribution of polylactic acid-glycolic acid copolymer-nanoparticle (PLGANPs) (A) and macrophage membrane-coated polylactic acid-glycolic acid copolymer nanoparticle (MPLNPs) (B) determined using Zetasizer Nano ZS. Transmission electron microscopy image of PLGANPs (C) and MPLNPs (D), macrophage membranes are marked by white arrows (bar = 50 nm)

以模拟动脉粥样硬化血管损伤。MTT 结果表明, 人脐静脉内皮细胞被 LPS 干预后, 细胞生长会受到明显抑制, 且该抑制作用存在浓度依赖性 (图 3A)。优化条件后, 最终选定造模所用 LPS 质量浓度为 $25 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, 孵育时间为 24 h。进一步通过 Western blot 表征发现, 未经 LPS 处理的内皮细胞无明显的 VCAM-1 表达, 而经不同浓度 LPS 孵育后, HUVEC 上的 VCAM-1 表达水平显著升高并呈剂量依赖性 (图 3B)。显微镜下观察可见: 对照组 HUVEC 细胞呈梭形或不规则三角形, 大部分细胞贴壁生长, 核清晰,

有些细胞鱼贯状相连 (图 3C); 而 LPS 处理组细胞形态有明显改变 (图 3D), 胞体变圆、边缘不清、细胞发生皱缩。

4 巨噬细胞膜仿生纳米载体体外靶向性初步评价

本实验以 LPS 诱导人脐静脉内皮细胞损伤作为动脉粥样硬化血管损伤模型, 以其对递药系统的摄取情况初步评价载体的体外靶向性。除 MPLNPs 及 PLGANPs 组外, 还特别设置了阻断组 (blocked MPLNPs)。分别经流式细胞术定量和荧光显微镜定性检测, 结果显示, LPS-HUVEC (图 4A) 对 MPLNPs 的

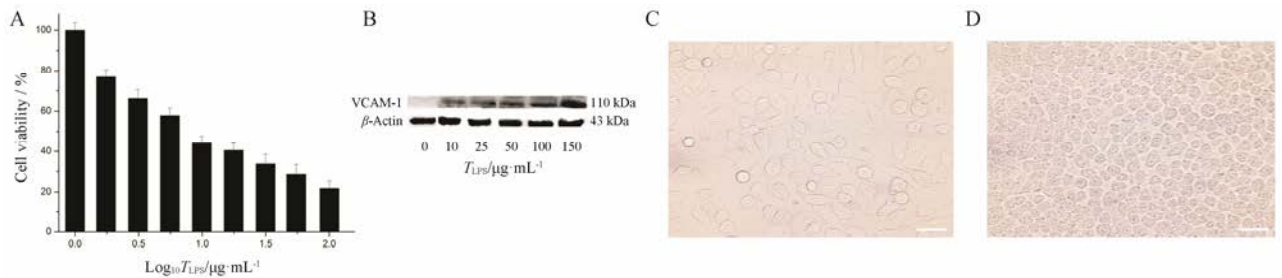


Figure 3 The characterization of human umbilical vein endothelial cells (HUVEC). A: The growth inhibition of lipopolysaccharide on HUVEC detected by MTT assay. B: Vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) in HUVEC determined by Western blot assay. Morphology of HUVEC before (C) and after (D) treatment by lipopolysaccharides (LPS, $25 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) (bar = $50 \mu\text{m}$)

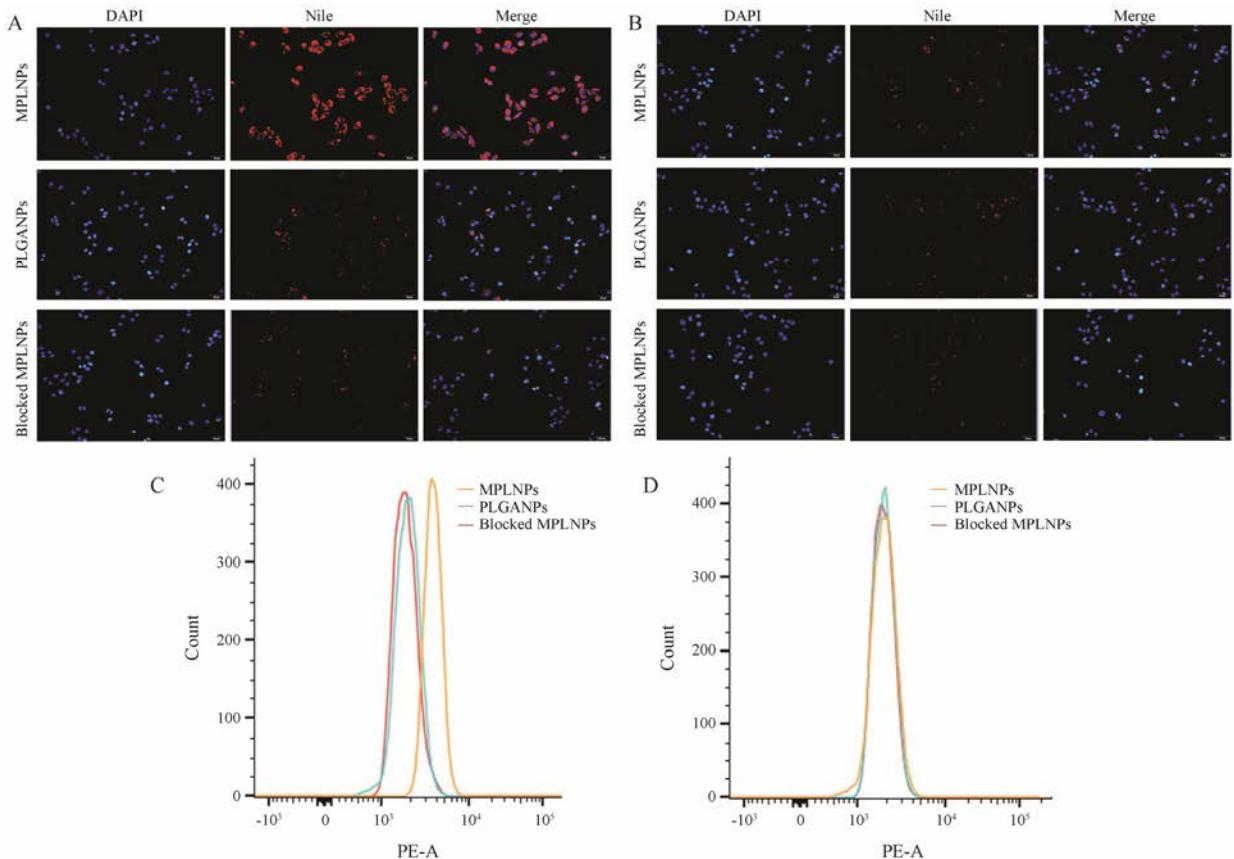


Figure 4 Evaluation of *in vitro* targeting ability. A: Fluorescence images of NPs uptake by LPS-HUVEC cells (bar = $50 \mu\text{m}$). B: Fluorescence images of NPs uptake by HUVEC cells (bar = $50 \mu\text{m}$). Flow cytometric analysis of NPs uptake by LPS-HUVEC cells (C) and HUVEC cells (D)

摄取显著高于 PLGANPs (前者摄取量为后者的 2.05 倍), 这表明经巨噬细胞膜包裹制备得到的 MPLNPs 能有效介导靶细胞摄取, 而当 MPLNPs 中 $\alpha 4\beta 1$ 整联蛋白被相应抗体中和后 (即 blocked MPLNPs), 细胞摄取明显减少; 而正常 HUVEC (图 4B) 对 MPLNPs、PLGANPs 及 blocked MPLNPs 的摄取均无明显差异。上述结果初步证明, MPLNPs 在体外具有较好的主动靶向性, 且该功能是基于 $\alpha 4\beta 1$ 整联蛋白与 VCAM-1 的特异性识别。

5 巨噬细胞膜仿生纳米载体体内靶向性初步评价

载脂蛋白 E (apolipoprotein E, ApoE) 是一种多态性蛋白, 参与脂蛋白的转化与代谢过程, 其基因可以调节许多生物学功能, 与动脉粥样硬化发生发展密切相关^[20]。研究表明, *ApoE*^{-/-}小鼠可在高脂饲料喂养下产生严重的高胆固醇血症, 并自发形成动脉粥样硬化斑块, 其斑块分布及病理特征与人类 AS 斑块极为相似, 是研究 AS 理想的动物模型^[21]。本实验以 *ApoE*^{-/-}小鼠通过高脂饲料喂养建立动脉粥样硬化模型, 对其进行病理评价及制剂靶向性研究。结果显示: 与正常组相比, 模型组血清 TC、TG 含量显著升高 ($P < 0.01$) (表 1); 模型组小鼠的胸主动脉血管壁较正常组厚, 且模型组小鼠血管内皮增厚、大量泡沫

细胞堆积、内皮细胞迁移和形成胆固醇结晶 (图 5A), 表明 AS 模型构建成功。在此基础上进行体内活体成像 (图 5B), 结果显示 MPLNPs 在动脉粥样硬化血管的蓄积程度明显高于 PLGANPs 和 blocked MPLNPs; 进一步进行主动脉切片免疫荧光共定位 (图 5C), 可见 PLGANPs 及 blocked MPLNPs 在病灶部位的荧光信号微弱, 而 MPLNPs 具有较强的红色荧光信号, 并与 VCAM-1 的绿色荧光较好地重叠; 通过对荧光强度进行定量分析 (图 5D), MPLNPs 的荧光强度为 PLGANPs 的 5.07 倍, 表明 MPLNPs 在病灶部位有效蓄积。

Table 1 Results of the serum lipid profile in mouse models of atherosclerosis. TC: Total cholesterol; TG: Triglyceride; HDL-C: High-density lipoprotein cholesterol; LDL-C: Low-density lipoprotein cholesterol. $n=3$, $\bar{x} \pm s$. ** $P < 0.01$ vs control group

Group	TC/ mmol·L ⁻¹	TG/ mmol·L ⁻¹	LDL-C/ mmol·L ⁻¹	HDL-C/ mmol·L ⁻¹
Control	3.15 ± 0.21	0.35 ± 0.06	0.92 ± 0.09	1.34 ± 0.21
Model	23.67 ± 1.12**	1.12 ± 0.28**	1.34 ± 0.24**	0.82 ± 0.23**

结论

本文基于巨噬细胞膜上 $\alpha 4\beta 1$ 整联蛋白与 VCAM-1 的高度亲和性, 设计并应用膜挤压法制备了一种具有

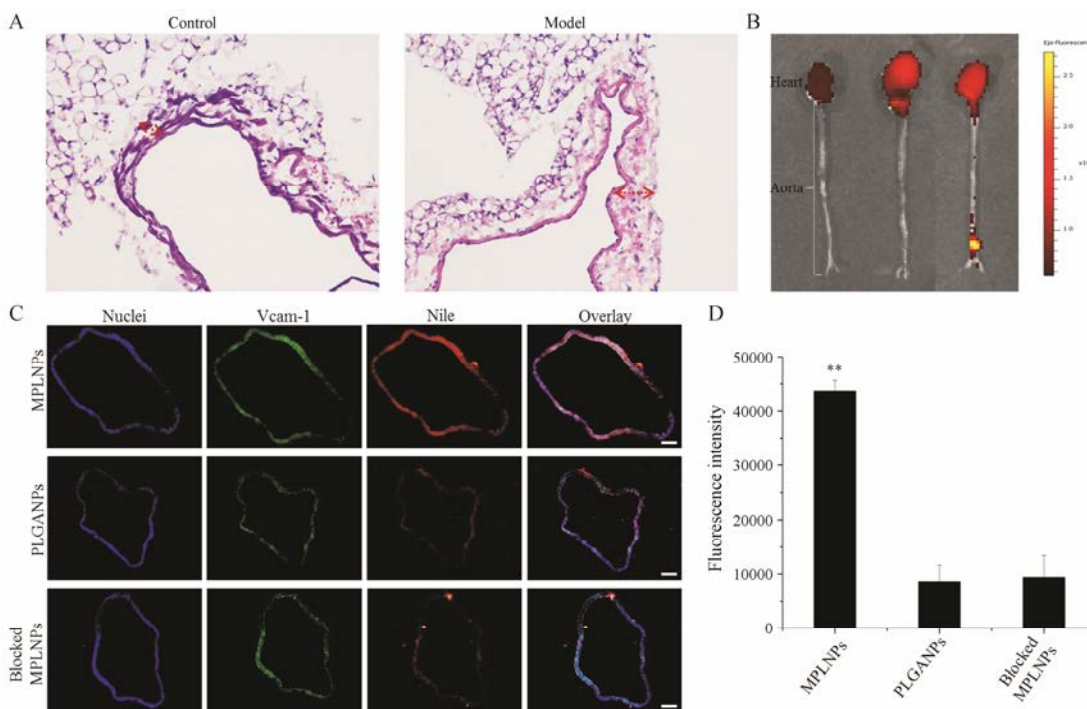


Figure 5 Evaluation of *in vivo* targeting ability. A: HE staining of the aorta cross-section. The vascular wall was marked by red circles. B: *In vivo* fluorescence imaging of NPs in the aorta from *ApoE*^{-/-} mice treated by PLGANPs, blocked MPLNPs and MPLNPs (from left to right) at the indicated time points. Fluorescence imaging (C) and quantitative results (D) for monitoring the colocalization of VCAM-1 (green) and Nile red loaded NPs (red). The aorta cross-section was denoted as cell clusters with blue stained nuclei (bar = 100 μ m). $n=3$, $\bar{x} \pm s$. ** $P < 0.01$ vs PLGANPs

靶向动脉粥样硬化病灶的核/壳纳米粒细胞膜仿生递药系统, 实验结果表明, MPLNPs 对靶受体 VCAM-1 具有较强的亲和力, 能有效识别靶细胞及体内靶组织; 所用巨噬细胞膜不仅可以包裹聚乳酸-羟基乙酸共聚物纳米粒, 还有望包裹脂质体等其他递药系统, 而相应制剂可负载小分子、生物大分子药物及示踪探针等, 实现疾病的诊断及治疗, 为后续抗动脉粥样硬化研究奠定了良好基础。

References

- [1] Hansson GK. Inflammation, atherosclerosis, and coronary artery disease [J]. *New Engl J Med*, 2005, 352: 1685–1695.
- [2] Kondo K, Kitagawa K, Nagai Y, et al. Associations of soluble intercellular adhesion molecule-1 with carotid atherosclerosis progression [J]. *Atherosclerosis*, 2005, 179: 155–160.
- [3] Brake DK, Smith EO, Mersmann H, et al. ICAM-1 expression in adipose tissue: effects of diet-induced obesity in mice [J]. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2006, 291: C1232–C1239.
- [4] Williams JK, Sukhova GK, Herrington DM, et al. Pravastatin has cholesterol-lowering independent effects on the artery wall of atherosclerotic monkeys [J]. *J Am Coll Cardiol*, 1998, 31: 684–691.
- [5] Tripathy D, Mohanty PS, Dhindsa S, et al. Elevation of free fatty acids induces inflammation and impairs vascular reactivity in healthy subjects [J]. *Diabetes*, 2003, 52: 2882–2887.
- [6] Hopkins AL, Groom CR, Alex A. Ligand efficiency: a useful metric for lead selection [J]. *Drug Discov Today*, 2004, 9: 430–431.
- [7] Lutgens E, Daemen MJ. CD40-CD40L interactions in atherosclerosis [J]. *Trends Cardiovasc Med*, 2002, 12: 27–32.
- [8] Corrado E, Rizzo M, Coppola G, et al. An update on the role of markers of inflammation in atherosclerosis [J]. *J Atheroscler Thromb*, 2010, 17: 1–11.
- [9] Li RX, He YW, Zhang SY, et al. Cell membrane-based nanoparticles: a new biomimetic platform for tumor diagnosis and treatment [J]. *Acta Pharm Sin B*, 2018, 8: 14–22.
- [10] Partlow KC, Lanza GM, Wickline SA. Exploiting lipid raft transport with membrane targeted nanoparticles: a strategy for cytosolic drug delivery [J]. *Biomaterials*, 2008, 29: 3367–3375.
- [11] Chen Q, Zhang XHF, Massagué J. Macrophage binding to receptor VCAM-1 transmits survival signals in breast cancer cells that invade the lungs [J]. *Cancer Cell*, 2011, 20: 538–549.
- [12] Cybulsky MI, Iiyama K, Li H, et al. A major role for VCAM-1, but not ICAM-1, in early atherosclerosis [J]. *J Clin Invest*, 2001, 107: 1255–1262.
- [13] Lu X, Mu E, Wei Y, et al. VCAM-1 promotes osteolytic expansion of indolent bone micrometastasis of breast cancer by engaging $\alpha 4 \beta 1$ -positive osteoclast progenitors [J]. *Cancer Cell*, 2011, 20: 701–714.
- [14] Fang RH, Hu CM, Luk BT, et al. Cancer cell membrane-coated nanoparticles for anticancer vaccination and drug delivery [J]. *Nano Lett*, 2014, 14: 2181–2188.
- [15] Cao H, Dan Z, He X, et al. Liposomes coated with isolated macrophage membrane can target lung metastasis of breast cancer [J]. *ACS Nano*, 2016, 10: 7738–7748.
- [16] Hu CMJ, Zhang L, Aryal S, et al. Erythrocyte membrane-camouflaged polymeric nanoparticles as a biomimetic delivery platform [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2011, 108: 10980–10985.
- [17] Moorjani M, Lejeune A, Gicquaud C, et al. Nanoerythrocytes, a new derivative of erythrocyte ghost II: identification of the mechanism of action [J]. *Anticancer Res*, 1996, 16: 2831–2836.
- [18] Vandermeeren M, Janssens S, Borgers M, et al. Dimethylfumarate is an inhibitor of cytokine-induced E-selectin, VCAM-1, and ICAM-1 expression in human endothelial cells [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 1997, 234: 19–23.
- [19] Zheng SG, Zhao MQ, Ren YN, et al. Effects of crocetin on VCAM-1 expression in human umbilical vein endothelial cells and monocyte-endothelial cell adhesion [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2015, 50: 34–38.
- [20] Davignon J, Gregg RE, Sing CF. Apolipoprotein E polymorphism and atherosclerosis [J]. *Arteriosclerosis*, 1988, 8: 1–21.
- [21] Zhang SH, Reddick RL, Piedrahita JA, et al. Spontaneous hypercholesterolemia and arterial lesions in mice lacking apolipoprotein E [J]. *Science*, 1992, 258: 468–471.