

靶向叶酸受体和线粒体的载雷公藤红素 PAMAM 纳米递药系统构建及体外抗炎作用

荆紫琪, 王 雪, 闫天月, 张玉杰*, 马鹏凯*

(北京中医药大学中药学院, 北京 102488)

摘要: 促炎巨噬细胞在类风湿性关节炎的发生和发展中发挥关键调控作用。本研究构建了一种可靶向叶酸受体和线粒体的载雷公藤红素 (celastrol, Cel) 聚酰胺-胺树枝状聚合物 (polyamide-amine dendrimer, PAMAM) 纳米递药系统, 实现可靶向炎症巨噬细胞的集化疗和光热于一体的协同治疗。以 PAMAM 为纳米载体, 通过酰胺反应偶联叶酸受体靶向基团叶酸 (folic acid, FA) 和线粒体靶向基团 IR808 (同时作为光热剂), 通过静电吸附作用负载抗炎药 Cel, 制备了 FA-PAMAM-IR808/Cel 纳米复合物。体外表征结果表明, 该纳米复合物中 Cel 载药量为 50.90%, 粒径为 130~160 nm, 平均电位在 1.0~3.5 mV, 释药呈现 pH 敏感性, 经近红外光照射 10 min 温度可达 42.5 °C; 体外摄取实验表明, 纳米复合物有明显的叶酸靶向性和线粒体靶向性; 纳米复合物在近红外光照后可显著增强细胞毒性和诱导细胞凋亡能力, 并浓度依赖性降低促炎因子肿瘤坏死因子 α (TNF- α)、白细胞介素-1 β (IL-1 β)、白细胞介素-6 (IL-6)、一氧化氮 (NO) 分泌量。本研究为开发新型的抗类风湿性关节炎纳米药物提供了思路。

关键词: 类风湿性关节炎; 雷公藤红素; 聚酰胺-胺树枝状聚合物; 叶酸; 线粒体

中图分类号: R945 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2023)03-0550-10

Construction of folate receptors and mitochondria targeting celastrol-loaded PAMAM nano-drug delivery system and its *in vitro* anti-inflammatory effect

JING Zi-qi, WANG Xue, YAN Tian-yue, ZHANG Yu-jie*, MA Peng-kai*

(School of Chinese Materia Medica, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 102488, China)

Abstract: Pro-inflammatory macrophages play key regulatory role in the occurrence and development of rheumatoid arthritis (RA). In this study, we constructed a celastrol (Cel)-loaded polyamide-amine dendrimer (PAMAM) drug delivery system, which could target folate receptor and mitochondria. It could target inflammatory macrophages and realize chemo-photothermal synergistic therapy. Using PAMAM as the nano-carrier, folate receptor-targeting group folic acid (FA) and mitochondria-targeting group IR808 (also known as the photothermal agent) were conjugated with PAMAM through amide reaction, and then complexed with anti-inflammatory drug Cel to prepare the FA-PAMAM-IR808/Cel nanocomplex. *In vitro* characterization results showed that the drug loading efficiency of the nanocomplex was 50.90%, particle size was between 130 and 160 nm, average potential was between 1.0 and 3.5 mV, the drug release showed pH sensitivity, temperature reached to 42.5 °C after near-infrared (NIR) light irradiation for 10 min. *In vitro* cellular uptake experiments showed that the nanocomplex had obvious folate receptor-targeting and mitochondria-targeting ability. Following irradiation with NIR light, the cytotoxicity

收稿日期: 2022-05-06; 修回日期: 2022-07-21.

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (82104404).

*通讯作者 Tel: 13701114864, E-mail: zhyj227@126.com;

Tel: 13121583863, E-mail: mapengkai1990@126.com

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2022-0539

and cellular apoptosis enhanced. The secretion of pro-inflammatory factors tumor necrosis factor α (TNF- α), interleukin (IL)-1 β , IL-6 and nitric oxide (NO) decreased in a concentration-dependent manner. This study provided insights for the development of novel anti-RA nanomedicines.

Key words: rheumatoid arthritis; celastrol; polyamide-amine dendrimer; folic acid; mitochondria

类风湿关节炎 (rheumatoid arthritis, RA) 是一种以侵蚀性关节炎为主要表现的全身性自身免疫病, 常造成关节破坏和畸形, 严重者可致残^[1,2]。RA 发病由多种免疫细胞和炎症因子介导, 其中最突出的是巨噬细胞。活化的巨噬细胞表达大量细胞因子和趋化因子, 包括肿瘤坏死因子 α (TNF- α)、白细胞介素 1 β (IL-1 β)、白细胞介素 6 (IL-6) 等, 从而激活成纤维样滑膜细胞 (fibroblast-like synovial cells, FLSs), 其无限增殖、迁移和侵袭, 最终导致软骨及骨组织损害^[3,4]。目前 RA 的治疗主要集中于炎症因子抑制与免疫抑制^[5-7], 如阿司匹林、甲氨蝶呤、英夫利昔单抗等, 而相关治疗药物不仅不良反应大、价格高昂, 且由于 RA 的发病机制复杂, 很难通过使用一种治疗手段来完全缓解 RA。因此, 在开发新的治疗药物的同时探索多种治疗手段相结合的联合治疗方案成为 RA 治疗趋势。

最近研究发现光热治疗 (photo-thermal therapy, PTT) 对 RA 有特殊优势。PTT 是利用光热剂在具有较强组织穿透的近红外光 (near-infrared light, NIR) 照射下产生的热量以消融恶性病变的一种治疗方式^[8]。与传统化疗相比, PTT 可实现时空可控地对病灶区域照射, 达到最大限度地减少不良反应的作用。IR808 作为经典的卟啉花菁素染料, 可靶向细胞线粒体, 是优良的光敏剂^[9], 并且 IR808 经近红外光照射后具有较强的光-热转换效果, 因此近年来常作为光热剂用于 PTT^[10]。我国治疗 RA 已有上千年历史, 雷公藤作为经方验方的常用中药, 其对 RA 疗效已为大量临床所证实。对其深入研究发现, 雷公藤红素 (celastrol, Cel) 是抗风湿中药雷公藤的活性成分之一, 其作用途径包括抑制炎症因子 IL-1 β 和 TNF- α 等的表达^[11]、抑制免疫细胞的过度募集, 从而减缓炎症反应及减少骨损害^[12,13]。然而, Cel 较差的水溶性、低生物利用度和全身毒性极大限制了其临床应用。因此, 若能通过新型递药方式整合 Cel 和光热剂作用优势, 对改善 Cel 成药性及 RA 临床治疗均具有重要价值。

纳米递药系统 (nano-drug delivery system, NDDS) 因能提高药物溶解度、改善药物药代动力学和组织分布、提高药物靶向性并降低不良反应, 近年来成为药剂学领域研究的热点^[14,15]。与脂质体、胶束、纳米粒等纳米载体相比, 聚酰胺-胺树枝状聚合物 (polyamide-

amine dendrimer, PAMAM) 具有均一的粒径、规整的球形结构、疏松的内部空腔, 特别是表面带有大量胺基基团, 可进行靶向配体、荧光探针的化学修饰, 表面胺基所带正电荷还可通过静电作用吸附药物, 这些特性使其成为应用价值极高的纳米载体^[16,17]。

本研究以 PAMAM 为纳米载体, 分别通过 FA 和 IR808 对其表面进行化学修饰, 合成可同时靶向炎症细胞叶酸受体和线粒体的 FA-PAMAM-IR808 共价偶联物, 随后通过其表面胺基正电荷吸附带有羧基基团的 Cel, 构建 FA-PAMAM-IR808/Cel 纳米复合物, 在特异性靶向到炎症细胞线粒体后, 可通过 Cel 化学作用及 IR808 光热作用, 促进依赖线粒体途径的炎症细胞凋亡, 从而有效抑制 RA。

材料与方法

试剂与耗材 PAMAM G4 (批号 MKCJ8572, 美国 Sigma Aldrich 公司); 叶酸 (folic acid, FA, 批号 D27D11S135592)、Cel (98%, 批号 P28M10F84300) (上海源叶生物科技有限公司); 1-乙基-(3-二甲氨基丙基) 碳二亚胺盐酸盐 [EDCI, 批号 WG0019757-170409001, 韶远化学科技 (上海) 有限公司]; 1-羟基苯并三唑 (HoBt, 批号 KCEB126, 北京伊诺凯科技有限公司); IR808 (99%, 批号 IR808-202001, 上海凯瑜琳医药科技有限公司); MD34-7000D 透析袋 (北京索莱宝科技有限公司); 娃哈哈水 (娃哈哈集团有限公司); 二甲基亚砜 (DMSO, 天津百伦斯生物技术有限公司); Hoechst 33342 (北京拜尔迪生物技术有限公司); YF488-Annexin V/PI 凋亡试剂盒 (北京百瑞极生物科技有限公司); 激光共聚焦培养皿 (无锡耐思生命科技股份有限公司)。

仪器 TU-1901 紫外分光光度计 (北京普析通用仪器有限责任公司); LGJ-10 真空冷冻干燥机 (北京松源华兴科技发展有限公司); AVANCE III HD 700 MHz 核磁共振波谱仪 (德国 Bruker 公司); LS45 荧光光谱仪、13UV003 激光共聚焦显微镜 (美国 PerkinElmer 公司); Sorvall ST 8R 高速冷冻离心机 (美国 Thermo 公司); Malvern Zetasizer Nano-ZS 动态光散射粒度仪 (英国 Malvern Instruments 公司); SIGMA 300 场发射扫描电镜 (德国 Zeiss 公司); JEM-2100 透射电子显微镜 (日本 JEOL 公司); A00-1102 流式细胞仪 [贝克曼库尔特

商贸(中国)有限公司]。

细胞 RAW264.7细胞(中国科学院细胞库)。

FA-PAMAM-IR808 偶联物的合成 合成路线如图1所示。称取FA (4.5×10^{-3} mmol)、EDCI (22.66×10^{-3} mmol) 和 HoBt (22.66×10^{-3} mmol) 于圆底烧瓶中, 以二甲基甲酰胺 (DMF) 和 DMSO 溶液 (3:1) 为溶剂溶解, 室温避光搅拌 2 h 活化 FA 羧基。PAMAM (0.9×10^{-3} mmol) 溶解于 DMSO 中, 加入到上述反应液中, 在室温下避光搅拌 24 h。反应结束后, 将反应液透析 24 h, 除去未反应的 FA 及催化剂, 过 $0.22 \mu\text{m}$ 微孔滤膜, 冻干即得 FA-PAMAM 偶联物。随后, 称取 IR808 (3.6×10^{-3} mmol) 溶解于 DMSO 中, 按上述反应条件活化 2 h, 加入 DMSO 溶解的 FA-PAMAM (0.72×10^{-3} mmol) 继续搅拌 24 h。反应结束后, 透析除去未反应的 IR808 及催化剂, 过 $0.22 \mu\text{m}$ 微孔滤膜, 冻干即得 FA-PAMAM-IR808 偶联物^[18]。采用核磁共振仪 ($^1\text{H NMR}$)、紫外-可见分光光度计 (UV-Vis)、荧光光谱仪 (FS, $\text{Em} = 780 \text{ nm}$ / $\text{Ex} = 808 \text{ nm}$) 对共价偶联物化学结构进行确证。建立 FA 和 IR808 的 UV-Vis 含量测定方法并进行方法学考察, 确定各分子连接数量。

FA-PAMAM-IR808/Cel 纳米复合物的制备 精密称取过量的 Cel (3.07×10^{-3} mmol) 于反应瓶中, 加 10 mL 甲醇溶解, 再向反应瓶中加入甲醇溶解的 FA-PAMAM-IR808 偶联物 (0.61×10^{-3} mmol), 室温下避光搅拌过夜, 反应液旋干, 加水复溶, $9\,000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 30 min, 取上层清液, 过 $0.22 \mu\text{m}$ 微孔滤膜, 冻干。

载药量 通过 HPLC 建立 Cel 定量方法, 并测定 FA-PAMAM-IR808/Cel 纳米复合物中 Cel 的负载量, 测定条件及方法如下。

色谱条件 使用 Kromasil C18 色谱柱 ($4.6 \text{ mm} \times 150 \text{ mm}$, $5 \mu\text{m}$), 流动相为甲醇-1% 乙酸 (90:10), 流速 $1.0 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$, 柱温 $25 \text{ }^\circ\text{C}$, 检测波长 422 nm ^[19]。

对照品溶液制备 精密称取 Cel 5.0 mg, 甲醇溶解并定容至 10 mL 量瓶中, 得到 $0.5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的对照品母液, 精密移取 1 mL 对照品母液, 定容到 50 mL 量瓶中, 得 $10 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的对照品储备液。分别精密移取对照品储备液 0.5、1、2、4、6、8 mL, 定容至 10 mL 量瓶中, 得到质量浓度分别为 0.5、1.0、2.0、4.0、6.0、8.0 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的系列对照品溶液。

载药量测定方法 精密称取过量的 Cel 于反应瓶中, 加 3 mL 甲醇溶解, 再向反应瓶中加入甲醇溶解的纳米复合物, 室温下搅拌过夜, 反应液旋干, 加水复溶, $9\,000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 30 min, 取沉淀, 加色谱甲醇溶解, 过 $0.22 \mu\text{m}$ 微孔滤膜, 按上述色谱条件进行测定, 记录峰面积, 根据标准曲线计算未负载的药物量, 计算方法如公式 (1)。

$$\text{载药量} = (\text{投料量} - \text{未负载量} / \text{纳米复合物量}) \times 100\% \quad (1)$$

粒径、电位及形态 纳米复合物 ($5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$) 分散于超纯水中, $0.22 \mu\text{m}$ 微孔滤膜过滤, 采用 Malvern Zetasizer Nano-ZS 动态光散射粒度仪测定纳米复合物的粒径、电位。采用扫描电子显微镜 (SEM) 和透射电子显微镜 (TEM) 观察纳米复合物的形态。

稳定性 将 FA-PAMAM-IR808、FA-PAMAM-IR808/Cel 分散于 pH 7.4 磷酸盐缓冲液 (PBS), 质量浓度为 $5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$, 于室温放置, 采用 Malvern Zetasizer Nano-ZS 动态光散射粒度仪测定 7 天内纳米复合物的粒径和多分散系数 (polymer dispersity index, PDI)。

光热转化效率 吸取 $200 \mu\text{L}$ 不同浓度的 FA-PAMAM-IR808/Cel 水溶液 (以 IR808 计为 5、10、 $20 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 于不透光 96 孔板中, 以水为空白对照, 用 808 nm 功率为 $1.5 \text{ W} \cdot \text{cm}^{-2}$ 的激光照射 600 s, 每 60 s 记录 1 次温度变化, 并用相同方法测定其 (以 IR808 计为 $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 在 3 种不同功率 (1.5 、 1 、 $0.5 \text{ W} \cdot \text{cm}^{-2}$) 激光

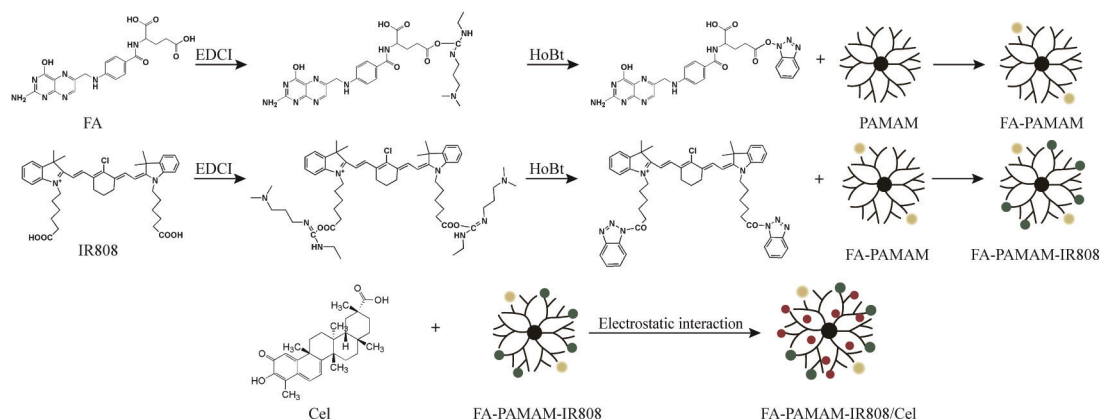


Figure 1 Schematic diagram of the synthetic route of the FA-PAMAM-IR808/Cel nanocomplex. FA: Folic acid; PAMAM: Polyamide-amine dendrimer; Cel: Celastrol

照射下的温度变化。

体外释药 采用透析法对 Cel 及 FA-PAMAM-IR808/Cel 的体外释放行为进行考察。配制 pH 5.0、7.4、8.8 的 PBS 溶液作为释放介质, 精密称取 Cel 及 FA-PAMAM-IR808/Cel 溶于相应的释放介质中, 得质量浓度为 $1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的含药溶液 (以 Cel 计)。精密移取 1.0 mL 于透析袋中, 将透析袋的两端用细线扎紧, 然后浸没于 50 mL 离心管中, 放置于恒温水浴振荡箱中 ($37 \text{ }^\circ\text{C}$ 、 $100 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$)。分别于放置后 10、15、30、45 min、1、2、4、8、12、24、36、48、60、72 h 取 1.0 mL 释放介质, 过 $0.22 \text{ }\mu\text{m}$ 微孔滤膜, 采用 HPLC 测定 Cel 浓度 C_d , 与此同时补加 1.0 mL 新鲜的释放介质至原释放介质中, 使释放介质总体积保持不变, 按公式 (2) 计算校正浓度 C_c , 按公式 (3) 计算累积释放率 $F(t)$, 其中 W_t 为载药偶联物中 Cel 含量。

$$C_c = C_d + 1/50 \sum_{i=1}^{n-1} C_d \quad (2)$$

$$F(t) = \frac{C_c \times 50}{W_t} \times 100\% \quad (3)$$

叶酸受体靶向性 激光共聚焦培养皿中以 5×10^4 个细胞/皿密度接种 RAW264.7 细胞, 待细胞融合到 80%, 用 PBS 冲洗 3 次, 加入 PAMAM-IR808/Cel、FA-PAMAM-IR808/Cel 溶液 (以 IR808 计浓度为 $4 \text{ }\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)。培养 4 h 后, 用 PBS 冲洗 3 次, 然后加 1 mL PBS 或无血清培养液, 将培养皿置于激光共聚焦显微镜下观察拍照, 评价不同药物细胞摄取情况。

此外, 配制 2 种浓度 FA-PAMAM-IR808/Cel 溶液 ($1、2 \text{ }\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$), 固定摄取时间, 观察给药 4 h 后细胞摄取情况; 固定药物浓度, 观察给药 4、8 h 后细胞摄取情况。

线粒体靶向性 取对数生长期 RAW264.7 细胞, 加入 3 mL 含纳米复合物的培养基 (以 IR808 计浓度为 $4 \text{ }\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$), 与细胞共孵育 8 h, 随后用移液枪小心将含纳米复合物的培养液移出, 细胞用预冷的 PBS 洗涤 3 次, 除去未被细胞摄取的纳米复合物。然后加入浓度为 $50 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 MitoTracker Green 线粒体荧光探针, 在培养箱中避光孵育 30 min; 再加入 1 mL 的 Hoechst 33342 ($10 \text{ }\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) 细胞核荧光探针, 继续避光孵育 20 min, 之后细胞用预冷的 PBS 洗涤 3 次除去游离染料。置于激光共聚焦显微镜下观测不同荧光在细胞内的分布, 并进行相关分析。

细胞毒性 实验分组: 共价偶联物组、Cel 原药组 ($\pm\text{NIR}$)、PAMAM-IR808/Cel 纳米复合物组 ($\pm\text{NIR}$)、FA-PAMAM-IR808/Cel 纳米复合物组 ($\pm\text{NIR}$)。RAW264.7 细胞培养在 96 孔板中, 以 1×10^5 个细胞/孔的密度种板。24 h 后, 加入药液 (以 Cel 计 $0.25 \sim 25 \text{ }\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 与细胞

共孵育 24 h, 细胞用预冷的 PBS 洗涤 3 次, 加入新鲜培养基, 继续培养 24 h。对于近红外光照射组, 细胞洗涤后加入新鲜培养基, 用 808 nm 激光照射 10 min ($1.5 \text{ W} \cdot \text{cm}^{-2}$), 继续培养 24 h。培养结束后弃掉培养基, 每孔加入 $100 \text{ }\mu\text{L}$ $0.5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ MTT 溶液, 并放入培养箱中继续孵育 4 h, 取出 96 孔板, 用移液枪移去各孔内培养基, 并加入 $150 \text{ }\mu\text{L}$ DMSO, 用酶标仪测定 490 nm 处各孔吸光度 (A) 值, 以未加药孔为对照, 按照公式 (4) 计算细胞存活率。

$$\text{存活率}(\%) = \frac{\text{实验组}A\text{值}}{\text{对照组}A\text{值}} \times 100\% \quad (4)$$

细胞凋亡 采用 YF488-Annexin V/PI 双染法检测细胞凋亡。RAW264.7 细胞于 6 孔板培养, 每孔 1×10^6 个细胞。24 h 后, 用 1 mL $5 \text{ }\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 药物溶液 (以 Cel 计算) 孵育 24 h, 小心移去药液, 然后用预冷 PBS 洗涤 3 次, 对于近红外光照射组, 用 808 nm 激光照射 10 min ($1.5 \text{ W} \cdot \text{cm}^{-2}$), 加入新鲜培养基, 继续孵育 24 h。孵育结束后用不含 EDTA 的胰酶消化, $1 \text{ }800 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 5 min , 预冷的 PBS 冲洗 2 次, 然后加入 $100 \text{ }\mu\text{L}$ PBS 重悬细胞, 每管加入 $5 \text{ }\mu\text{L}$ YF488-Annexin V 和 PI 工作液, 室温下避光孵育 $10 \sim 15 \text{ min}$, 孵育结束后加入 $400 \text{ }\mu\text{L}$ PBS, 流式细胞仪检测。

FA-PAMAM-IR808/Cel 纳米复合物对细胞炎症因子的调节作用 将 RAW264.7 细胞以 5×10^5 个/孔的密度接种于 24 孔板中, 培养 24 h 后弃旧培养基, 分别加入以完全培养基稀释的各浓度药物 (根据 MTT 细胞活力实验, 选择以 Cel 计浓度为 $0.25、0.50、1.00 \text{ }\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的纳米复合物溶液), 并设置空白组、LPS 模型组、Cel 组、PAMAM-IR808/Cel ($\pm\text{NIR}$) 组、FA-PAMAM-IR808/Cel ($\pm\text{NIR}$) 组, 其中 Cel 组、PAMAM-IR808/Cel ($\pm\text{NIR}$) 组、FA-PAMAM-IR808/Cel ($\pm\text{NIR}$) 组设高、中、低浓度, 每个浓度设 3 个复孔。药物作用细胞 4 h 后, 加入含 $1 \text{ }\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ LPS 的 DMEM 培养基, 孵育 $48 \text{ h}^{[20]}$ 。培养结束后, 收集上清培养液, $3 \text{ }500 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 10 min , 取上清液用 ELISA 试剂盒测定 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 因子及一氧化氮 (NO) 含量。

统计学分析 使用 SPSS 17.0 软件通过单因素方差分析对数据进行统计学分析。实验数据以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 比较组间差异, $P < 0.05$ 表示统计学差异。

结果

1 FA-PAMAM-IR808 共价偶联物化学结构表征

首先, 合成了可靶向叶酸受体和线粒体的共价偶联物, 用于负载抗炎药物 Cel。FA-PAMAM、FA-PAMAM-

IR808的 ^1H NMR如图2A所示, δ_{H} 2.0~3.5为PAMAM氢特征峰^[21], 其中 $\delta_{\text{H}} = 2.20\sim 2.35$ ppm (H_3), $\delta_{\text{H}} = 2.45\sim 2.53$ ppm (H_5), $\delta_{\text{H}} = 2.62\sim 2.72$ ppm (H_4), $\delta_{\text{H}} = 2.91\sim 3.00$ ppm (H_1), $\delta_{\text{H}} = 3.10\sim 3.20$ ppm (H_2), $\delta_{\text{H}} = 3.29\sim 3.36$ ppm (H_6)。 δ_{H} 7~8为FA、IR808的芳香氢特征峰^[22]; 不同偶联物UV-Vis扫描结果如图2B所示, FA-PAMAM、FA-PAMAM-IR808均在285 nm处显示叶酸特征吸收峰, FA-PAMAM-IR808在808 nm处显示IR808特征吸收峰; 荧光光谱如图2C所示, FA-PAMAM-IR808的荧光信号在808 nm处有与IR808相同的最大发射波长。因此, 从 ^1H NMR、UV-Vis及FS检测结果可确定, FA、IR808均成功连接到PAMAM上。

2 FA-PAMAM-IR808/Cel纳米复合物理化性质表征

2.1 载药量

通过紫外分光光度法对FA和IR808连接个数进行了定量分析。叶酸在最大吸收波长285 nm处标准曲线回归方程为: $y = 0.063x + 0.035$, $R^2 = 0.996$ (图3A); IR808在最大吸收波长808 nm处标准曲线回归方程为: $y = 0.1138x - 0.0069$, $R^2 = 0.999$ (图3B)。经计算, 每个FA-PAMAM-IR808共价偶联物中FA和IR808连接个数分别为1.60和4.55。

分别进样Cel对照品溶液和空白溶剂, Cel色谱峰保留时间为10.0 min且无其他干扰(图3C), 专属性符合含量测定要求; Cel在 $0.5\sim 10\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的标准曲线回归方程为 $y = 13.839x - 5.7649$, $R^2 = 0.993$, 线性良好, 符合测定要求。经计算, FA-PAMAM-IR808/Cel中负载Cel的含量为50.90%, 封装率为67.48%。

2.2 粒径、电位及形态表征

通过动态光散射粒度仪和扫描电镜对纳米复合物的粒径、电位和形态等物理化学性质进行了表征。粒径、电位结果如图3D、E所示, FA-PAMAM-IR808/Cel纳米复合物的粒径在130~160 nm, 平均电位在1.0~3.5 mV; 从扫描电镜和透射电镜结果可观测到其形态近为球形(图3F、G)。

2.3 稳定性考察

FA-PAMAM-IR808偶联物和FA-PAMAM-IR808/Cel纳米复合物稳定性考察结果如图3H所示, 室温下放置7天, FA-PAMAM-IR808偶联物、FA-PAMAM-IR808/Cel纳米复合物的粒径在130~160 nm, PDI在0.22~0.26, 在7天内均无明显变化, 说明FA-PAMAM-IR808偶联物和FA-PAMAM-IR808/Cel纳米复合物稳定性较好。

2.4 体外光热效应评价

通过温度变化对FA-PAMAM-IR808/Cel的体外光热效应进行评价。结果如图3I所示, 在808 nm近红外光照射下温度变化呈现明显的浓度依赖性和激光功率依赖性。FA-PAMAM-IR808/Cel(以IR808计, 浓度为 $20\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)使用激光功率为 $1.5\ \text{W}\cdot\text{cm}^{-2}$, 照射时间为600 s时, 温度可达 $42.5\ ^\circ\text{C}$, 说明可迅速将808 nm的光能转化为热能, 已超过对细胞产生杀伤作用的温度($40\ ^\circ\text{C}$)。

2.5 体外释药

利用透析法对Cel及FA-PAMAM-IR808/Cel的体外释药行为进行评价, 结果如图3J所示, 可看出Cel和FA-PAMAM-IR808/Cel的体外释药行为均呈现显著的pH依赖性, 随着pH增大, 释药速率加快, 同时在碱性条件下, FA-PAMAM-IR808/Cel在24 h

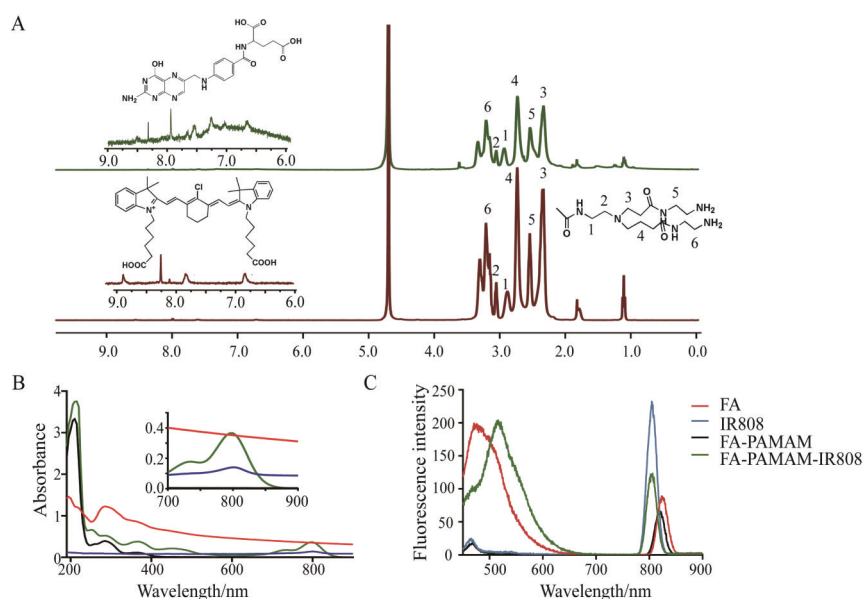


Figure 2 Structural characterization of the FA-PAMAM and FA-PAMAM-IR808 conjugates. A: Nuclear magnetic resonance hydrogen (^1H NMR) spectrum of conjugates; B: Ultraviolet and visible (UV-Vis) spectrum of conjugates at concentration of $1\ \text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$; C: Fluorescence spectrum of conjugates at concentration of $10\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. Wavelength: $\text{Em} = 780\ \text{nm}$, $\text{Ex} = 808\ \text{nm}$. $n = 6$, $\bar{x} \pm s$

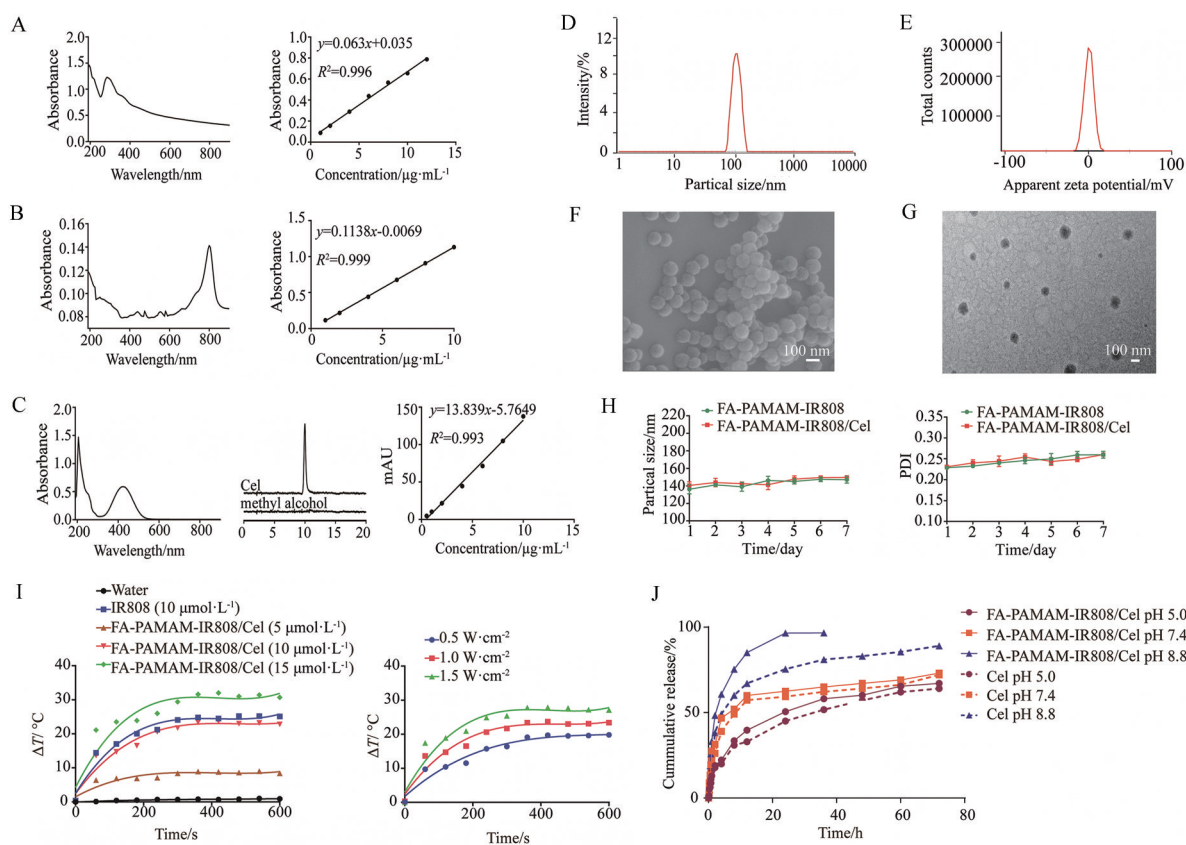


Figure 3 Characterization of the physicochemical properties of the FA-PAMAM-IR808/Cel nanocomplex. A, B: UV-Vis scanning spectrum and standard curve of FA (A) and IR808 (B); C: UV-Vis scanning spectrum, chromatogram and standard curve of Cel; D: Particle size distribution graph of the FA-PAMAM-IR808/Cel nanocomplex; E: Potential distribution graph of the FA-PAMAM-IR808/Cel nanocomplex; F: Scanning electron microscope (SEM) image of the FA-PAMAM-IR808/Cel nanocomplex; G: Transmission electron microscope (TEM) image of the FA-PAMAM-IR808/Cel nanocomplex. Scale bar: 100 nm; H: Particle size and polymer dispersity index (PDI) change curves of the FA-PAMAM-IR808/Cel nanocomplex in 7 days; I: Temperature change curves of the FA-PAMAM-IR808/Cel nanocomplex with different concentration after irradiation with different power density of near-infrared light (NIR); J: Drug release curve of the FA-PAMAM-IR808/Cel nanocomplex. $n = 6, \bar{x} \pm s$

内 Cel 几乎完全释放, 明显高于 Cel 原药。

3 细胞摄取

通过激光共聚焦显微镜考察了 PAMAM-IR808/Cel 和 FA-PAMAM-IR808/Cel 纳米复合物被细胞摄取的情况, 结果如图 4 所示, 修饰了 FA 的纳米复合物相比于不修饰 FA 的纳米复合物, 其被 RAW264.7 细胞摄取的能力显著增加, 说明造成细胞摄取增加的原因是通过细胞表面过表达的 FA 受体对 FA 靶向配体的特异性识别和转运作用; 此外, RAW264.7 细胞对 FA-PAMAM-IR808/Cel 的摄取具有浓度和时间依赖性的特点, 随着共孵育时间和浓度增加, 细胞摄取增加 (图 4)。

4 细胞靶向性研究

通过激光共聚焦显微镜观测各纳米复合物被摄取进入细胞后的细胞内定位, 结果如图 5 所示, IR808 本身呈红色荧光, 代表的是纳米复合物的分布情况; 细胞核被 Hoechst 33342 荧光探针试剂标记成蓝色荧光; 利

用 MitoTracker Green 线粒体荧光探针试剂将线粒体标记为绿色荧光。当 PAMAM 连接线粒体靶向基团 IR808 后, 纳米复合物进入细胞后大多聚集到线粒体部位, 具有明显的线粒体靶向性。

5 体外药效学研究

5.1 细胞毒性评价 采用 MTT 法评价了空白载体、Cel 及各载药偶联物在不同条件下对 RAW264.7 细胞的毒性作用。结果如图 6A 所示, 空白载体组 FA-PAMAM-IR808 较 PAMAM、PAMAM-IR808 在不同浓度下毒性差异明显 ($P < 0.05$), 说明连接靶向基团 FA 后细胞毒性增强。Cel 及 PAMAM-IR808/Cel、FA-PAMAM-IR808/Cel 对 RAW264.7 细胞的增殖抑制作用均随浓度增加而增大, 在无其他因素干扰下, $5 \sim 25 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 浓度的 FA-PAMAM-IR808/Cel 和 PAMAM-IR808/Cel 比 Cel 原药表现出更强的细胞毒性 ($P < 0.05$), 并且 FA-PAMAM-IR808/Cel 和 PAMAM-IR808/Cel 的细胞毒性也有明显

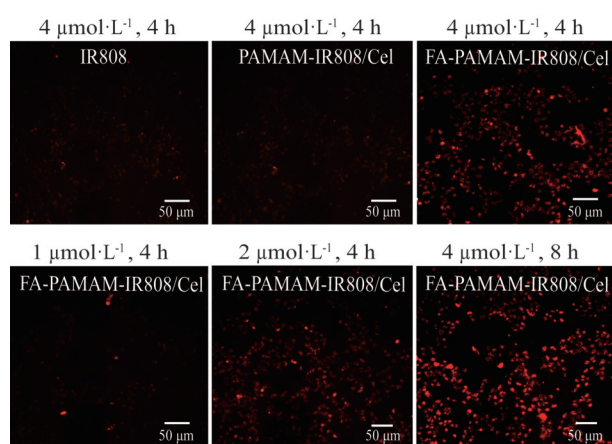


Figure 4 Confocal laser scanning microscope images of RAW264.7 cells after uptake different drugs (IR808, PAMAM-IR808/Cel and FA-PAMAM-IR808/Cel, $4 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) for 4 h, and treatment of RAW264.7 cells with the FA-PAMAM-IR808/Cel nanocomplex at different concentrations and time points. Scale bar: $50 \mu\text{m}$

差异 ($P < 0.05$); 在近红外光照射条件下, PAMAM-IR808/Cel、FA-PAMAM-IR808/Cel 的细胞毒性与正常组相比明显增强 ($P < 0.05$), Cel 的细胞毒性无明显变化; 同时给予近红外光照射时, 在 $20\sim 25 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 浓度的 FA-PAMAM-IR808/Cel 和 PAMAM-IR808/Cel 显示更强的细胞毒性, 并且强于 Cel 的细胞毒性 ($P < 0.05$) (图 6B、C)。Cel (\pm NIR)、PAMAM-IR808/Cel (\pm NIR)、FA-PAMAM-IR808/Cel (\pm NIR) 的 IC_{50} 值分别为 $18.19/17.92$ 、 $16.56/12.53$ 、 $8.10/6.84 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ (图 6D)。在近红

外光照射下, FA-PAMAM-IR808/Cel 的细胞毒性作用是在正常条件下的 1.18 倍, 是 Cel 的 2.66 倍, 说明光热治疗可显著增强细胞毒性, 增强抑炎效果。

5.2 细胞凋亡 利用双染法评价了 Cel 和各纳米复合物对细胞凋亡作用的影响, 结果如图 6E、F 所示, 与空白对照组相比, Cel 及各纳米复合物的细胞凋亡率均显著提高, 在近红外光照射下, FA-PAMAM-IR808/Cel (82.85%) 诱导细胞凋亡作用增强 ($P < 0.05$), 且高于 Cel, 显示最强的凋亡诱导作用 ($P < 0.05$)。其中近红外光照射占主导作用, 表明通过化疗联合光热治疗可增强诱导细胞凋亡作用。

6 FA-PAMAM-IR808/Cel 对炎症因子的影响

通过 ELISA 法对 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 和 NO 的含量进行测定, 4 种炎症因子的标准曲线如图 7A 所示, 在 $0.1\sim 2.5 \text{pg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 时与吸光度值呈线性关系。用 $1 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的 LPS 诱导 RAW264.7 细胞后, 细胞炎症因子 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 及 NO 的分泌水平明显高于对照组 (图 7B), 说明已成功构建 RAW264.7 细胞炎症模型。各给药组在和 LPS 共同孵育细胞 48 h 后, 对不同因子的抑制效果不同, 且显示出剂量差异 (图 7C)。对 TNF- α 、IL-1 β 和 IL-6 因子的检测结果显示, FA-PAMAM-IR808/Cel + NIR 组与 Cel 组、FA-PAMAM-IR808/Cel 组相比显著降低了 RAW264.7 细胞分泌的 3 种因子的含量 ($P < 0.05$)。对于 NO 而言, FA-PAMAM-IR808/Cel + NIR 组在 $1.0 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时显示出与 Cel 组、FA-PAMAM-IR808/Cel 组的明显差异 ($P < 0.05$)。总之, 在高浓度下, FA-

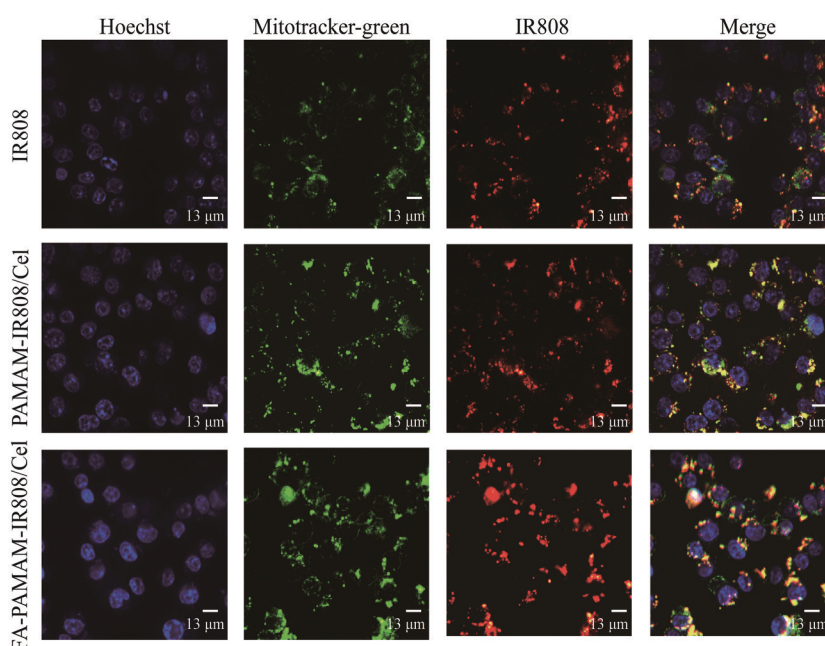


Figure 5 Organelle localization images of RAW264.7 cells after uptake the IR808, PAMAM-IR808/Cel nanocomplex and FA-PAMAM-IR808/Cel nanocomplex. Scale bar: $13 \mu\text{m}$

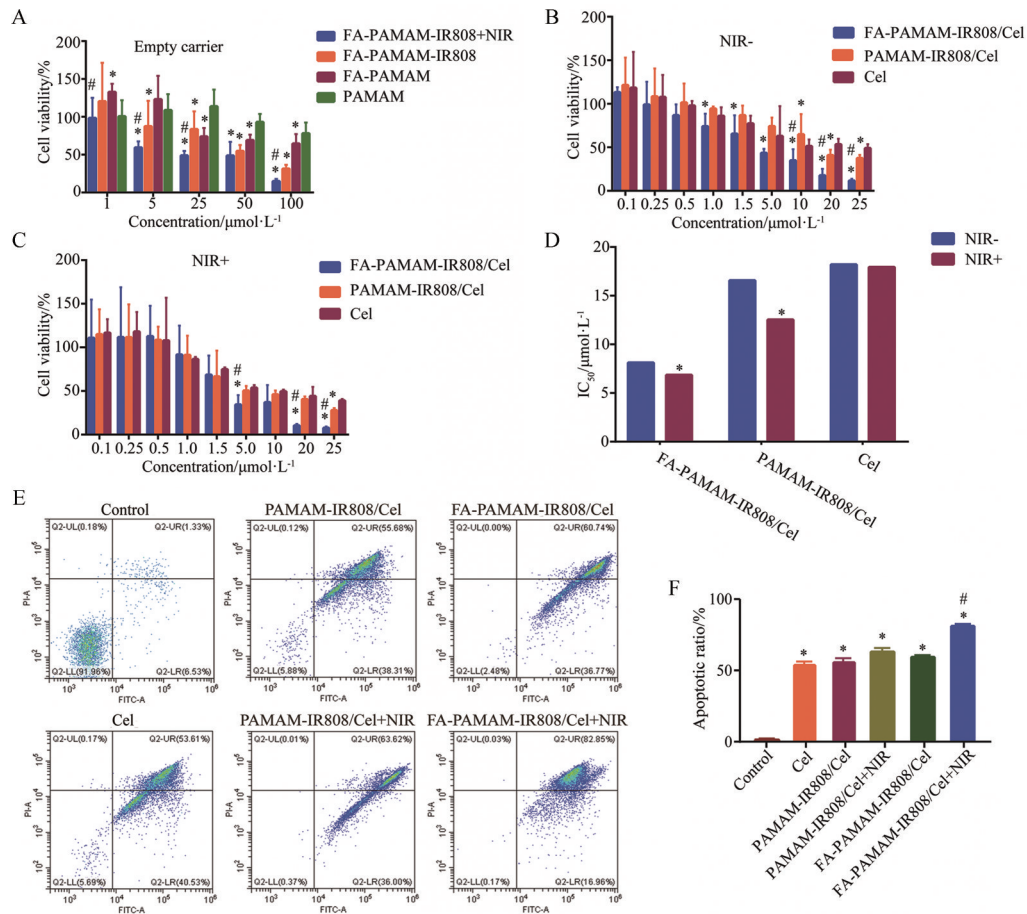


Figure 6 Cytotoxicity and apoptosis of Cel, conjugates and nanocomplex to RAW264.7 cells. A: Cell survival rate of empty carrier. $^*P < 0.05$ vs PAMAM; $^{\#}P < 0.05$ vs FA-PAMAM-IR808; B, C: Cell survival rate of Cel and nanocomplexes to RAW264.7 cells without (B) or with (C) NIR irradiation. $^*P < 0.05$ vs Cel; $^{\#}P < 0.05$ vs PAMAM-IR808/Cel; D: Half maximal inhibitory concentration (IC_{50}) of the Cel, PAMAM-IR808/Cel, FA-PAMAM-IR808/Cel nanocomplex with or without NIR irradiation. $^*P < 0.05$ vs without NIR irradiation; E: Flow cytometer spot map of RAW264.7 cells after treatments with the Cel, PAMAM-IR808/Cel nanocomplex and FA-PAMAM-IR808/Cel nanocomplex with or without NIR irradiation; F: Apoptosis analyses of flow cytometer spot map. $^*P < 0.05$ vs control; $^{\#}P < 0.05$ vs Cel. $n = 6$, $\bar{x} \pm s$

PAMAM-IR808/Cel 纳米复合物在近红外光照射下使 LPS 诱导的 RAW264.7 细胞的 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 和 NO 分泌量明显降低, 说明 FA-PAMAM-IR808/Cel 能够抑制炎症巨噬细胞中炎症因子的产生。

讨论

雷公藤制剂临床上主要用于治疗 RA、强直性脊柱炎和银屑病等免疫系统疾病。Cel 作为中药雷公藤的活性成分, 由于其广泛的抗肿瘤、抗炎、抗氧化等药理活性而备受关注, 但其较差的溶解性和较强的不良反应是制约其向临床转化的关键。本研究所构建的 FA-PAMAM-IR808/Cel 纳米复合物, Cel 主要是通过静电作用吸附在 PAMAM 上, 与其他 Cel 纳米制剂如脂质体、胶束等通过物理包裹实现载药的机制不同, 其载药

量可高达 50.90%, 有效解决了 Cel 溶解性差的问题, 同时使其具备 pH 响应的特点, 在线粒体基质碱性条件下, 通过打破静电平衡实现快速释药, 减少在体内循环和正常组织生理环境下的药物泄露。此外, 纳米复合物利用巨噬细胞过表达 FAR 介导的线粒体靶向作用, 可显著提高细胞摄取, 将药物高效递送到作用靶标线粒体, 极大提高了药效, 降低脱靶效应所致的全身毒性。

我国在几千年前已将热疗应用在“寒痹证”的治疗中, 借助热气进入体内, 起到散寒驱邪、舒筋活络及缓解疼痛等作用, 结合现代科技的光热治疗因其时空可控的优点, 已广泛应用于肿瘤等疾病的治疗^[23], 于风湿的治疗目前还处于探索之中, 本研究所构建的 FA-PAMAM-IR808/Cel 纳米复合物, 在经过 808 nm 下 1.5 W·cm⁻² 的激光照射后, 短时间内温度即可达到 42.5 °C, 具有优良的光热转化效率。近红外光照射下,

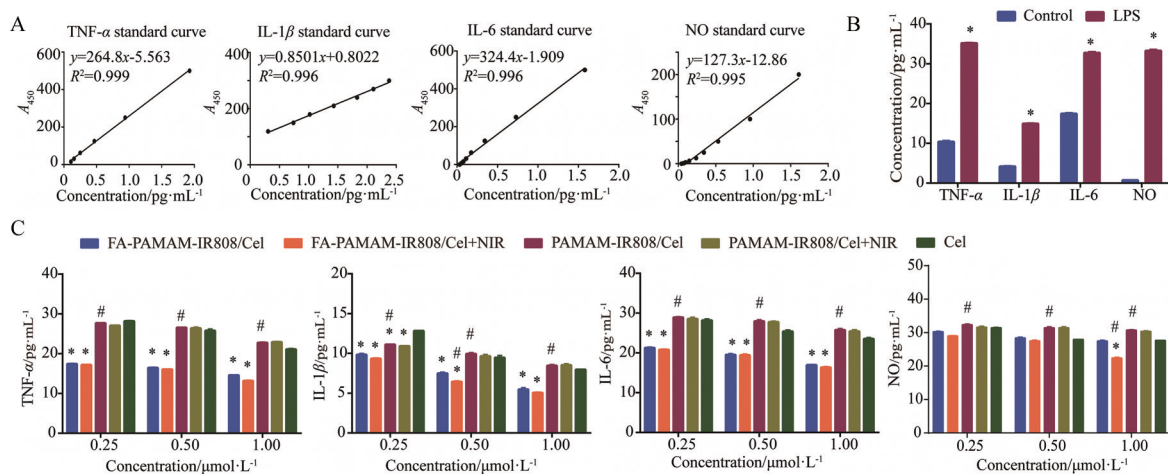


Figure 7 A: Standard curves of tumor necrosis factor α (TNF- α), interleukin (IL)-1 β , IL-6 and nitric oxide (NO) used for enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) determination. B: Secretion level of inflammatory cytokines by RAW264.7 cells after induced with lipopolysaccharide (LPS, 1 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$). * $P < 0.05$ vs control. C: The content of TNF- α , IL-1 β , IL-6, and NO secreted by RAW264.7 cells after treatment with different drugs. * $P < 0.05$ vs Cel; # $P < 0.05$ vs FA-PAMAM-IR808/Cel. $n = 6$, $\bar{x} \pm s$

纳米复合物对 RAW264.7 巨噬细胞的细胞毒性与诱导细胞凋亡能力显著增强, 能消灭病变部位过度募集的巨噬细胞, 减少炎症因子的释放, 从而减缓 FLSs 对关节的侵袭, 其在动物模型上的药效有待进一步验证。

综上所述, 本研究构建的 FA-PAMAM-IR808/Cel 纳米复合物增加了 Cel 的溶解性, 通过 FAR 和线粒体双重靶向作用, 以及 Cel 化学治疗和 IR808 光热治疗的联合作用, 提高了药效并降低了不良反应, 是一种极具开发前景的纳米药物。

作者贡献: 荆紫琪负责实验操作、数据处理和初稿撰写; 王雪负责细胞培养; 闫天月负责数据核对; 张玉杰、马鹏凯负责课题的设计、指导和论文修改。

利益冲突: 所有作者均声明不存在利益冲突。

References

- [1] Delft MAM, Huizinga TWJ. An overview of autoantibodies in rheumatoid arthritis [J]. *J Autoimmun*, 2020, 110: 102392.
- [2] Smolen JS. Insights into the treatment of rheumatoid arthritis: a paradigm in medicine [J]. *J Autoimmun*, 2020, 110: 102425.
- [3] Weyand CM, Goronzy JJ. Immunometabolism in the development of rheumatoid arthritis [J]. *Immunol Rev*, 2020, 294: 177-187.
- [4] Boutet MA, Courties G, Nerviani A, et al. Novel insights into macrophage diversity in rheumatoid arthritis synovium [J]. *Autoimmun Rev*, 2021; 20: 102758.
- [5] Raterman HG, Bultink IE, Lems WF. Osteoporosis in patients with rheumatoid arthritis: an update in epidemiology, pathogenesis, and fracture prevention [J]. *Expert Opin Pharmacother*, 2020, 21: 1725-1737.
- [6] Wang YY, Chang Y, Wei W. Research progress on the abnormal metabolism of macrophages in rheumatoid arthritis pathogenesis [J]. *Acta Pharm Sin* (药学报), 2020, 55: 2827-2833.
- [7] Chandrupatla DMSH, Molthoff CFM, Lammertsma AA, et al. The folate receptor β as a macrophage-mediated imaging and therapeutic target in rheumatoid arthritis [J]. *Drug Deliv Transl Res*, 2019, 9: 366-378.
- [8] Ma LY, Feng S, Zhang S, et al. A synergistic photothermal antibacterial system based on silver-infused functionalized mesoporous carbon nanospheres [J]. *Acta Pharm Sin* (药学报), 2022, 57: 1155-1162.
- [9] Leitão MM, de Melo-Diogo D, Alves CG, et al. Prototypic heptamethine cyanine incorporating nanomaterials for cancer phototheragnostic [J]. *Adv Health Mater*, 2020, 9: e1901665.
- [10] Zhang P, Ke JX, Tu DT, et al. Enhancing dye-triplet-sensitized upconversion emission through heavy atom effect in CsLu2F7: Yb/Er nanoprobes [J]. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2022, 61: e202112125.
- [11] Zhou W, Liu ZG, Song WZ. Effect of celastrol on bone erosion in mice with rheumatoid arthritis [J]. *Chin J Clin Pharmacol* (中国临床药理学杂志), 2021, 37: 2476-2480.
- [12] Liu LY, Zhang Z, Ge NJ, et al. Effect of ciplolysaccharide on LPS-induced inflammatory response in RAW264.7 macrophages [J]. *Chin Pharm J* (中国药理学杂志), 2021, 56: 1479-1485.
- [13] Li JM, Jiang Q, Tang XS, et al. Research progress on regulation of innate immune system in rheumatoid arthritis by *Tripterygium wilfordii* and its extracts [J]. *Chin J Chin Mater Med* (中国中药杂志), 2019, 44: 3384-3390.
- [14] Yan WL, Lang TQ, Yin Q, et al. Progress on active tumor-targeting nano drug delivery systems for improving tumor immunotherapy [J]. *Acta Pharm Sin* (药学报), 2022, 57: 46-63.
- [15] Qamar Z, Qizilbash FF, Iqbal MK, et al. Nano-based drug

- delivery system: recent strategies for the treatment of ocular disease and future perspective [J]. *Recent Pat Drug Deliv Formul*, 2019, 13: 246-254.
- [16] Xiao T, Li D, Shi X, et al. PAMAM dendrimer-based nanodevices for nuclear medicine applications [J]. *Macromol Biosci*, 2020, 20: e1900282.
- [17] Surekha B, Kommana NS, Dubey SK, et al. PAMAM dendrimer as a talented multifunctional biomimetic nanocarrier for cancer diagnosis and therapy [J]. *Colloids Surf B Biointerfaces*, 2021, 204: 111837.
- [18] Wei GJ, Chen JH, Jing ZQ, et al. Glucose transporter 1 (GLUT1)-targeting and hypoxia-activated mitochondria-specific chemothermal therapy *via* a glycosylated poly(amido amine)/celastrol (PAMAM/Cel) complex [J]. *J Colloid Interface Sci*, 2022, 608: 1355-1365.
- [19] Duan SR, Zhou YR, Song CY, et al. Determination of celastrol by QuEChERS-Ultra performance liquid chromatography-mass spectrometry and their thermal stability [J]. *Food Safe Qual Detec Technol* (食品安全质量检测学报), 2021, 12: 5170-5176.
- [20] Chen ZL, Wu JJ, Zhi W, et al. Effect of Shibawei Tangshen pill extract on Akt/p38MAPK signaling pathway and M1/M2 polarization with LPS induced RAW264.7 cells [J]. *Chin Pharm J* (中国药学杂志), 2022, 57: 38-43.
- [21] Qin H, Long J, Zhou J, et al. Use of phosphorylated PAMAM and carboxylated PAMAM to induce dentin biomimetic remineralization and dentinal tubule occlusion [J]. *Dent Mater J*, 2021, 40: 800-807.
- [22] Mirsafaei R, Varshosaz J, Mirsattari SN. Folate-targeted polyacrylamide/punicic acid nanomicelles for flutamide delivery in prostate cancer: characterization, *in vitro* biological evaluation, and its DFT study [J]. *Recent Pat Nanotechnol*, 2020, 14: 360-374.
- [23] Xu ZY, Shi JF, Xian J, et al. Research progress on anti-tumor mechanism of celastrol alone and in combination [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2021, 52: 4372-4385.