甘露糖靶向−活性氧响应丹参酮IIA纳米粒的制备及抗心肌炎症研究

杨千年[1,2], 吕迎兰[3], 刘雨菲[1,2], 董健藤[3], 刘雪梅[1,2], 王晓晖[1],
李 春[1*], 王金铃[1*]

(1. 北京中医药大学, 北京中医药研究院, 中药现代研究中心, 北京 102488; 2. 北京中医药大学中药学院, 北京 102488; 3. 北京中医药大学中医学院, 北京 102488)

摘要: 本研究以甲氧基聚乙二醇−二硫键−聚乳酸羟基乙酸共聚物 ($mPEG_{5k}$-SS-$PLGA_{60k}$) 和磷脂聚乙二醇甘露糖 (DSPE-PEG_{5k}-Man) 为载体, 丹参酮IIA (tanshinone IIA, Tan IIA) 为模型药物, 采用纳米沉淀法制备了兼具甘露糖靶向和活性氧响应的双功能丹参酮IIA纳米粒 (Tan IIA/M-NPs)。通过单因素实验得到优选工艺参数, 确定最佳条件为: 药物与载体质量比为1∶12、油水体积比为1∶10、泊洛沙姆浓度为2.0%、超声时间为12 min、靶向材料修饰比例为10%。Tan IIA/M-NPs的平均粒径为198.3 ± 2.8 nm、多分散性系数为0.224 ± 0.002, zeta电位为−2.62 ± 0.94 mV, 包封率为 (94.41 ± 0.36)%。体外细胞实验结果显示: Tan IIA浓度在0.1～100 μmol·L^{-1}内, Tan IIA、空白纳米粒和Tan IIA/M-NPs均具有良好的生物相容性, 对巨噬细胞无明显毒性; 经甘露糖修饰的Tan IIA/M-NPs对炎性巨噬细胞的摄取效率显著高于未修饰组; Tan IIA/M-NPs可显著降低巨噬细胞炎症因子 (TNF-α、IL-1β) 的分泌水平、抑制NO生成, 降低M1型巨噬细胞比例、促进M2型巨噬细胞极化, 并降低细胞内活性氧水平。Tan IIA/M-NPs具有良好的载药能力, 可以通过甘露糖靶向和ROS响应性释放而增强Tan IIA对心肌炎症的抑制作用, 为丹参酮IIA治疗心肌梗死后炎症调控和组织修复提供新的研究思路。

关键词: 丹参酮IIA; 甘露糖靶向; 活性氧响应; 心肌炎症; 抗炎

中图分类号: R943 **文献标识码**: A **文章编号**: 0513-4870(2026)02-0593-09

Preparation of mannose-targeted and reactive oxygen species-responsive tanshinone IIA nanoparticles and their study on anti-myocardial inflammation

YANG Qian-nian[1,2], LV Ying-lan[3], LIU Yu-fei[1,2], DONG Jian-teng[3], LIU Xue-mei[1,2], WANG Xiao-hui[1], LI Chun[1*], WANG Jin-ling[1*]

(*1. Modern Research Center for Traditional Chinese Medicine, Beijing Institute of Traditional Chinese Medicine, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 102488, China; 2. School of Chinese Materia Medica, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 102488, China; 3. School of Traditional Chinese Medicine, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 102488, China*)

Abstract: In the study, bifunctional tanshinone IIA nanoparticles (Tan IIA/M-NPs) with both mannose targeting and reactive oxygen species response were prepared by nanoprecipitation using methoxypoly (ethylene glycol)-disulfide bond-poly (lactic acid hydroxyacetic acid) copolymer ($mPEG_{5k}$-SS-$PLGA_{60k}$) and phospholipid poly (ethylene glycol) mannan (DSPE-PEG_{5k}-Man) as the carriers, and tanshinone IIA (Tan IIA) as the model drug.

收稿日期: 2025-04-14; 修回日期: 2025-07-22.
基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (82173987).
*通讯作者 E-mail: lichun19850204@163.com; wangjinljng22@163.com
DOI: 10.16438/j.0513-4870.2025-0410

The preferred process parameters were obtained through one-way experiments, and the optimal conditions were determined as follows: a drug-to-carrier mass ratio of 1∶12, an oil-to-water volume ratio of 1∶10, a peloxam concentration of 2.0%, a sonication time of 12 min, and a targeting material modification ratio of 10%. the average particle size of Tan IIA/M-NPs was 198.3 ± 2.8 nm, and the polydispersity coefficient. The average particle size of Tan IIA/M-NPs was 198.3 ± 2.8 nm, the polydispersity index (PDI) was 0.224 ± 0.002, the zeta potential was −2.62 ± 0.94 mV, and the encapsulation rate was (94.41 ± 0.36)%. The results of *in vitro* cellular experiments showed that Tan IIA concentration in the range of 0.1−100 μmol·L^{-1}, Tan IIA, blank vector and Tan IIA/M-NPs were all biocompatible with each other and had no significant toxicity to macrophages; the uptake efficiency of inflammatory macrophages by mannose-modified Tan IIA/M-NPs was significantly higher than that of the unmodified group; and Tan IIA /M-NPs significantly reduced the secretion level of macrophage inflammatory factors (TNF-α, IL-1β), inhibited NO production, decreased the proportion of M1-type macrophages, promoted the polarization of M2-type macrophages, and decreased the intracellular level of reactive oxygen species. Tan IIA/M-NPs had a good drug-carrying capacity, and could enhance the inhibitory effect of Tan IIA *via* mannose targeting and ROS-responsive release. The inhibitory effect on myocardial inflammation provides a new research idea for the regulation of inflammation and tissue repair after myocardial infarction treated with tanshinone IIA.

Key words: tanshinone IIA; mannose targeting; reactive oxygen species responsiveness; myocardial inflammation; anti-inflammatory

心肌梗死 (myocardial infarction, MI) 是一种常见的心血管疾病, 具有较高的死亡率和致残率, 其病理机制与过度激活的炎症反应及活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 的异常生成密切相关[1]。MI发生后, 大量被募集到梗死区域的单核细胞分化成巨噬细胞, 在清除心肌梗死组织以及伤口修复、重塑过程中发挥重要作用[2]。巨噬细胞大致分为M1和M2两种表型。在MI炎症期, 巨噬细胞主要表现为M1型, 分泌炎性细胞因子和趋化因子, 并激活NADPH氧化酶系统产生过量ROS, 加重心肌组织损伤[3,4]; 在MI修复期, M2型巨噬细胞增多, 释放抗炎细胞因子并促进血管生成和伤口愈合[5]。梗死后巨噬细胞的表型转化受局部微环境的调节, M1和M2巨噬细胞之间的动态平衡对梗死后心肌损伤修复有关键作用[2,6,7]。

ROS作为细胞代谢的天然副产物, 包含超氧阴离子 ($O_2^{\cdot-}$)、羟基自由基 (·OH) 和过氧化氢 (H_2O_2)。心肌梗死发生时, 心肌细胞、内皮细胞、炎症细胞以及血小板过量生成ROS, 打破氧化还原稳态, 引发氧化应激损伤, 进一步加重心肌损伤与功能障碍[3]。ROS还能够作为信号分子, 促使巨噬细胞向M1表型极化, 加剧炎症级联反应; 同时, 过度激活的炎症反应可以促使巨噬细胞生成ROS, 形成炎症−氧化应激的恶性循环[8]。因此, 对巨噬细胞相关ROS的异常累积以及炎症的过度激活进行双重调控, 有望成为改善心肌微环境、推动心脏修复的关键治疗策略。

丹参酮IIA (tanshinone IIA, Tan IIA) 作为丹参主要活性成分, 在心血管保护方面表现出显著的ROS清除和抗炎作用[9]。然而, Tan IIA的水溶性差、首过效应显著及代谢半衰期短等不足, 限制了其临床应用[10]。采用纳米化技术将Tan IIA封装于纳米递送系统中, 不仅能够提升药物的生物利用度, 还能通过载体材料的结构修饰赋予纳米粒功能化特性[11,12]。甲氧基聚乙二醇−二硫键−聚乳酸−羟基乙酸共聚物 [methoxy poly (ethylene glycol)-poly (lactic-*co*-glycolic acid), mPEG$_{5k}$-SS-PLGA$_{60k}$] 是一种具有ROS响应特性的两亲性嵌段共聚物, 作为装载药物的优良载体, 其分子中的二硫键可在高ROS微环境中特异性断裂, 实现病灶部位的可控释药[13]。巨噬细胞作为心肌梗死后炎症反应的核心, 其表面过表达甘露糖受体, 采用磷脂聚乙二醇甘露糖 (DSPE-PEG$_{5k}$-Man) 作为配体材料修饰纳米粒, 可以提高纳米粒对炎性巨噬细胞的主动靶向能力, 增强其在炎症部位的特异性积累[14]。

本研究以mPEG$_{5k}$-SS-PLGA$_{60k}$和DSPE-PEG$_{5k}$-Man为载体, 采用纳米沉淀法制备了兼具甘露糖靶向和活性氧响应双重功能的丹参酮IIA纳米粒 (Tan IIA/M-NPs), 并考察其制剂学性质; 以脂多糖 (LPS) 刺激的RAW264.7巨噬细胞为心肌炎症细胞模型, 对Tan IIA/M-NPs的体外抗心肌炎症作用进行评价。

材料与方法

材料 丹参酮IIA (95%, S31459, 上海源叶生物科技有限公司); 丹参酮IIA标准品 (98%, CHB231030, 成都克洛玛生物科技有限公司); mPEG$_{5k}$-SS-PLGA$_{60k}$ (RM019283)、DSPE-PEG$_{5k}$-Man (RM018284) 购自西安瑞禧生物有限公司; DSPE-PEG$_{5k}$ (YS-DM20, 重庆渝偲医药科技有限公司); 泊洛沙姆407 (K2301462, 上海阿

拉丁生化科技股份有限公司); 香豆素6 (C16649571)、脂多糖 (L861706) 购自上海麦克林生化科技股份有限公司; 高糖DMEM培养基 (G4511, 武汉赛维尔生物科技有限公司); 胰酶 (2517104)、CCK-8试剂盒 (K001082341)、TNF-α试剂盒 (m1002095)、IL-1β试剂盒 (ml3018140) 购自北京兰博利德商贸有限公司; NO试剂盒 (BC1470)、活性氧荧光探针 (DCFH-DA, D6470) 购自北京索莱宝科技有限公司。

仪器 旋转蒸发仪 (BÜCHI R-210, 瑞士步琦有限公司); 万分之一电子天平、十万分之一电子天平 [ME 204、S105, 梅特勒–托利多仪器 (上海) 有限公司]; 超声破碎仪 (CPX500, 北京中科科尔仪器有限公司); Nano-ZS型粒度测定仪 (ZEN3690, 英国Malvern公司); Eppendorf高速离心机 [德国艾本德 (上海) 国际贸易有限公司]; 高效液相色谱仪 (岛津LC-20ADXR, 日本岛津公司); 流式细胞仪 (Beckman贝克曼公司)。

细胞 RAW264.7巨噬细胞购自中国医学科学院基础医学研究所北京协和医学院细胞资源中心。

Tan IIA/M-NPs的制备

甘露糖靶向、ROS响应性纳米粒 称取处方量的Tan IIA、mPEG$_{5k}$-SS-PLGA$_{60k}$及DSPE-PEG$_{5k}$-Man, 溶于丙酮中形成有机相。冰浴条件下, 将有机相缓慢注入泊洛沙姆407 (F127) 溶液中, 探头超声分散后, 旋转蒸发去除有机溶剂, 溶液经0.8 μm滤膜过滤后, 即得Tan IIA/M-NPs。采用相同方法制备不含Tan IIA的空白纳米粒, 记为M-NPs。

ROS响应性非靶向纳米粒 采用同上的制备方法, 将DSPE-PEG$_{5k}$替代DSPE-PEG$_{5k}$-Man, 制备具有ROS响应但无甘露糖靶向功能的对照纳米粒, 记为Tan IIA/SS-NPs。

荧光标记的纳米粒 选用香豆素6 (C6) 作为荧光探针替代Tan IIA, 采用相同方法制备荧光标记的C6/M-NPs和C6/SS-NPs, 用于细胞摄取实验。

Tan IIA/M-NPs的包封率

高效液相色谱法测定Tan IIA/M-NPs的包封率 采用Inertsil ODS-SP色谱柱 (250 mm × 4.6 mm, 5 μm), 流动相为乙腈–0.2%乙酸水溶液 (80∶20), 柱温为30 ℃, 体积流量为1.0 mL·min^{-1}, 检测波长为270 nm, 进样体积为10 μL。

丹参酮IIA标准曲线的绘制 精密称取Tan IIA对照品10 mg, 适量甲醇超声溶解, 转移至25 mL量瓶中, 甲醇定容至刻度线, 得400 μg·mL^{-1} Tan IIA对照品储备液。用甲醇稀释对照品储备液, 分别配制成质量浓度为1、5、10、30、50、80、100 μg·mL^{-1}的系列对照品溶液, 进样测定。以Tan IIA质量浓度为横坐标 (X), Tan IIA各质量浓度对应的峰面积为纵坐标 (Y), 进行线性回归, 得回归方程为Y = 47 087X − 11 361, r = 0.999 7。

Tan IIA/M-NPs的包封率测定 取未经过滤的Tan IIA/M-NPs混悬液和经0.8 μm水系滤膜过滤的纳米粒, 分别加入一定体积甲醇超声破乳, 测定其中Tan IIA含量。根据公式 (1) 计算包封率 (encapsulation efficiency, EE):

EE (%) = 过滤后纳米粒中Tan IIA含量/未过滤混悬液中Tan IIA总含量×100% (1)

Tan IIA/M-NPs制备方法的单因素考察 以粒径、包封率为指标, 通过单因素实验对药物与载体 (mPEG$_{5k}$-SS-PLGA$_{60k}$) 质量比、油水体积比、乳化剂浓度、超声时间进行考察, 优化处方工艺。

以平均荧光强度为指标, 通过细胞摄取实验筛选靶向材料占比 (即DSPE-PEG$_{5k}$-Man与载体质量比)。分别制备含10%和20% DSPE-PEG$_{5k}$-Man的香豆素6标记的M-NPs (10% C6/M-NPs和20% C6/M-NPs)。将RAW264.7细胞以每孔2×10^{5}个细胞的密度接种于12孔板中, 1 μg·mL^{-1} LPS刺激24 h后, PBS清洗3次, 空白DMEM培养30 min。加入等荧光强度的10% C6/M-NPs和20% C6/M-NPs, 孵育2 h后, 收集细胞, PBS清洗、重悬, 过200目尼龙网, 流式细胞仪检测荧光强度。

Tan IIA/M-NPs的表征

粒径检测 采用马尔文粒度仪测定Tan IIA/M-NPs的平均粒径、多分散性系数 (polydispersity index, PDI) 和zeta电位。

Tan IIA/M-NPs的H_2O_2敏感性 将Tan IIA/M-NPs样品溶液与含有10 mmol·L^{-1} H_2O_2的PBS溶液共孵育, 孵育24 h后, 测定其粒径分布, 以评价制剂的H_2O_2敏感性。

稳定性考察 将制备好的Tan IIA/M-NPs样品溶液密封放置于4 ℃冰箱保存, 连续7天测量其粒径和PDI变化。

体外释放实验 采用透析法, 以含或不含10 mmol·L^{-1} H_2O_2的0.5%十二烷基磺酸钠 (SDS) PBS (pH 7.4) 溶液作为释放介质, 考察Tan IIA溶液和Tan IIA/M-NPs的体外释放行为。具体如下: 分别量取含等质量Tan IIA的Tan IIA乙醇溶液及Tan IIA/M-NPs混悬液, 移入透析袋 (截留分子质量12～14 kDa) 中, 置于0.5% SDS释放介质中; 同时另取含等质量Tan IIA的Tan IIA/M-NPs混悬液, 置于含10 mmol·L^{-1} H_2O_2的0.5% SDS释放介质中, 37 ℃摇床 (120 r·min^{-1}) 中振摇, 分别于0.5、1、2、4、6、8、12、24 h取样0.5 mL, 并补充等体积预温介质。采用高效液相测定释放介质中Tan IIA的含量, 计算累积释放率, 绘制释放曲线, 并对

曲线进行释放模型拟合。

Tan IIA/M-NPs细胞毒性实验 采用CCK-8法评估制剂生物相容性。将RAW264.7细胞以每孔2×10^4个细胞的密度接种于96孔板, 1 μg·mL^{-1} LPS刺激24 h后, 分别加入不同浓度 (0.1～100 μmol·L^{-1}) 的游离Tan IIA、空白纳米粒M-NPs及Tan IIA/M-NPs, 每浓度设3复孔, 继续培养24 h后, 每孔加入10 μL CCK-8溶液孵育1 h, 于450 nm波长下检测吸光度值并计算细胞存活率。

Tan IIA/M-NPs的体外靶向性评价 采用流式细胞术, 以LPS刺激的RAW264.7细胞为模型, 评价甘露糖靶向和非靶向制剂的摄取情况, 并通过游离甘露糖竞争性抑制实验进一步验证制剂的甘露糖靶向性。具体方法如下: 将RAW264.7细胞经LPS刺激后, 分别加入空白培养液或甘露糖溶液 (2 mmol·L^{-1}) 预孵育0.5 h后, 将同等荧光强度的C6/SS-NPs、C6/M-NPs及2 mmol·L^{-1}甘露糖 + C6/SS-NPs、2 mmol·L^{-1}甘露糖 + C6/M-NPs与细胞共孵育2 h后, 收集细胞, 流式细胞仪测定平均荧光强度。

Tan IIA/M-NPs对RAW264.7巨噬细胞中NO水平的调控作用 将RAW264.7细胞以每孔1×10^4个细胞接种到96孔板中, 培养过夜后, 去除培养液, 分别加入20 μmol·L^{-1} Tan IIA、Tan IIA/SS-NPs、Tan IIA/M-NP, 同时设置空白组和LPS组, 每组3个复孔。4 h后, 给药组和模型组加入1 μg·mL^{-1}浓度的LPS, 空白组加入等体积的空白培养基, 24 h后取收集上清, 并按照NO试剂盒测定细胞上清液中NO水平。

Tan IIA/M-NPs对RAW264.7巨噬细胞中炎症因子分泌的抑制作用 将RAW264.7细胞以每孔2×10^5个细胞的密度接种在12孔培养板中, 培养过夜后, 弃去培养基, 分别加入含有20 μmol·L^{-1} Tan IIA、Tan IIA/SS-NPs和Tan IIA/M-NPs预培养4 h后, 加入1 μg·mL^{-1} LPS孵育处理24 h。仅加入空白培养液组为空白对照组, 仅加入1 μg·mL^{-1} LPS刺激24 h组为LPS模型组。收集上清液, 1 200 r·min^{-1}转速下离心15 min, 按照ELISA试剂盒的操作说明检测上清中TNF-α、IL-1β的含量。

Tan IIA/M-NPs对RAW264.7巨噬细胞极化的调控作用 将RAW264.7细胞以每孔3×10^5个细胞的密度接种于6孔板中, 培养过夜后, 分别加入Tan IIA、Tan IIA/SS-NPs和Tan IIA/M-NPs预培养4 h, 弃去溶液后加入1 μg·mL^{-1} LPS共培养24 h。同时以空白组为对照组和LPS组为模型组。PBS清洗细胞2次后, 胰酶消化、收集细胞; 依次加入anti-CD86-FITC和anti-CD206-APC抗体避光孵育15 min后, 标记巨噬细胞表面标志物, 离心收集细胞, PBS清洗2次后, 流式细胞仪检测。

Tan IIA/M-NPs对RAW264.7巨噬细胞中ROS的清除作用 将RAW264.7细胞以每孔8×10^4个细胞的密度接种于6孔板中培养过夜后, 分别设置空白组、LPS组、Tan IIA组、Tan IIA/SS-NPs组、Tan IIA/M-NP组, 预给药4 h后加入1 μg·mL^{-1} LPS共培养24 h。培养结束后弃去培养液, PBS清洗两遍, 避光下加入预先配制的含2′,7′-二氯荧光素二乙酸酯 (DCFH-DA) 荧光探针 (5 μmol·L^{-1}) 的无酚红DMEM培养基,继续培养30 min后, 弃去培养液, PBS清洗两遍后, 倒置荧光显微镜成像。

数据分析和处理 本研究数据以平均值 ± 标准差的形式来展示。采用GraphPad Prism 9.5进行单因素方差分析和t检验进行数据差异性检验, 对数据进行分析及图表绘制。$P < 0.05$差异具有统计学意义。

结果

1 Tan IIA/M-NPs制备方法的优化

1.1 Tan IIA/M-NPs制备方法的单因素考察 采用纳米沉淀法制备负载Tan IIA的靶向纳米粒Tan IIA/M-NPs。以粒径和包封率为指标, 对制剂制备中药物与载体质量比 ($M_{\text{Tan IIA}}$∶$M_{\text{mPEG5k-SS-PLGA60k}}$ = 1∶4、1∶8、1∶12)、油水体积比 (V_{O}∶V_{W} = 1∶5、1∶10、1∶15)、乳化剂浓度 (x% = 0.5、1.0、2.0, *w*/*w*)、超声时间 (2、6、12 min) 进行考察。从图1A、B中可以看出, 当药物与载体比为1∶12、油水体积比为1∶10、乳化剂浓度为2.0%、超声时间为12 min, 获得的Tan IIA/M-NPs粒径最小, 包封率最高。

M-NPs中甘露糖靶向修饰材料比例的确定。DSPE-PEG$_{5k}$-Man修饰的M-NPs可以和巨噬细胞表面的甘露糖受体特异性结合, 靶向材料修饰比例可以影响巨噬细胞对制剂的摄取效率。结果如图1C所示, 10% C6/M-NPs在炎性巨噬细胞中的平均荧光强度显著高于20% C6/M-NPs组 ($P < 0.001$), 这可能与配体的空间位阻效应及与受体的竞争性结合有关。当配体修饰比例较高时容易产生空间位阻, 阻碍受体识别, 减少游离纳米粒与受体的结合, 进而降低细胞摄取[15]。10%甘露糖修饰比例相较于20%更接近受体最佳结合密度, 因此选择该修饰比例进行后续研究。

1.2 Tan IIA/M-NPs的优化工艺验证 根据优化结果, 确定最佳处方为: 药物与载体质量比1∶12、油水体积比1∶10、F127浓度2.0%、超声时间12 min、靶向材料修饰比例为10%。平行制备3批Tan IIA/M-NPs, 测得平均粒径为198.3 ± 2.8 nm, PDI为0.224 ± 0.002, zeta电位为−2.62 ± 0.94 mV, 包封率为 (94.41 ± 0.36)%。结果表明, 该处方工艺稳定, 重现性良好。

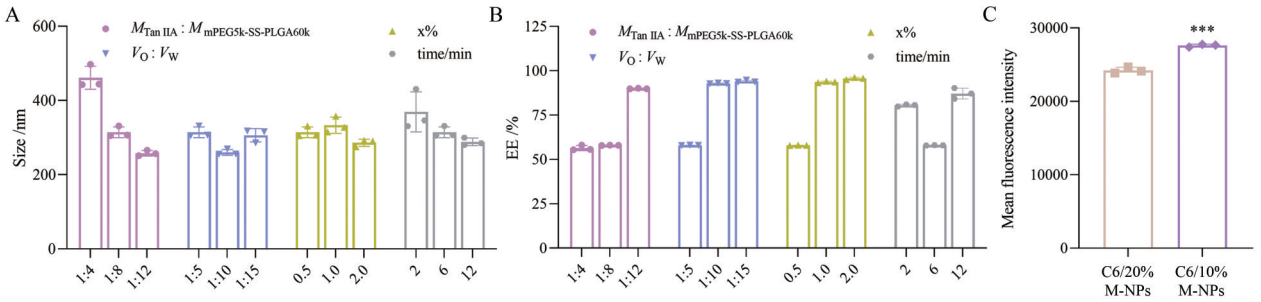


Figure 1 Formulation optimization of bifunctional tanshinone IIA nanoparticles (Tan IIA/M-NPs). A: Size distribution of Tan IIA/M-NPs in different prescriptions; B: Encapsulation efficiency of Tan IIA/M-NPs in different prescriptions; C: Cellular Uptake of C6/20% M-NPs and C6/10% M-NPs in LPS-induced Raw264.7 macrophages. n = 3, $\bar{x} \pm s$. $^{***}P < 0.001$ *vs* C6/20% M-NPs group. EE: Encapsulation efficiency

2 Tan IIA/M-NPs的表征

2.1 粒径、电位考察 马尔文粒度仪测得Tan IIA/M-NPs的粒径为195.3 nm, PDI为0.222, zeta电位为−1.70 mV, 呈电中性 (图2A), 表明Tan IIA/M-NPs粒径较小, 均一性良好。

2.2 Tan IIA/M-NPs的H_2O_2敏感性 与H_2O_2共孵育24 h后, Tan IIA/M-NPs的粒径分布呈现多峰特征, PDI升至0.401 (图2B), 表明体系均一性降低; 同时, 纳米粒表面zeta电位由−1.70 mV负移至−14.1 mV。该现象是因为二硫键响应性断裂导致外层PEG_{5k}脱落, 表面化学性质发生改变[16]。结果显示, 所构建的Tan IIA/M-NPs具有ROS响应性。

2.3 储存稳定性考察 Tan IIA/M-NPs在低温条件下储存7天内, 粒径和PDI无显著变化 (图2C), 表明制得的Tan IIA/M-NPs具有较高的稳定性。

2.4 体外释放实验 如图2D所示, 游离Tan IIA 0.5 h内累积释放率超过72%, 2 h释放近90%, 呈现快速释放特性。Tan IIA/M-NPs在0.5% SDS PBS (pH 7.4)中, 持续而缓慢的释放Tan IIA, 且并未发生突释现象[17], 24 h累积释放率为54.91%, 表明Tan IIA包载于纳米粒中具有缓释效应。同时由图可知, Tan IIA/M-NPs在含10 mmol·L^{-1} H_2O_2的介质中, 药物释放曲线与无H_2O_2 (0.5% SDS PBS)介质中的释放曲线相似[18], 但其24 h累积释放率增加至65.39%, 证实了Tan IIA/M-NPs可在高ROS环境下二硫键断裂并加速药物释放, 因而Tan IIA/M-NPs在心肌炎症巨噬细胞 (高ROS微环境)

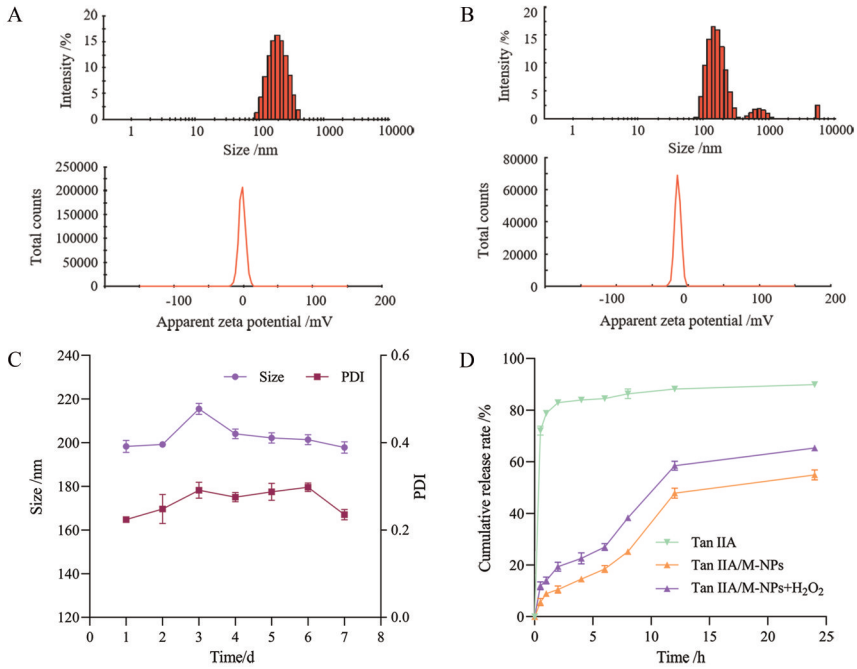


Figure 2 Characterization of Tan IIA/M-NPs. A, B: Size distribution and zeta potential of Tan IIA/M-NPs (A) and Tan IIA/M-NPs with 10 mmol·L^{-1} H_2O_2 (B); C: Storage stability of Tan IIA/M-NPs at 4 ℃ for 7 days; D: The release profiles of Tan IIA and Tan IIA/M-NPs in 0.5% SDS with or without 10 mmol·L^{-1} H_2O_2. n = 3, $\bar{x} \pm s$. PDI: Polydispersity index

中响应性释药，可提高疗效。Tan IIA/M-NPs 在0.5%SDS中的释放曲线模型拟合结果见表1。由相关系数R^2大小可知，Tan IIA/M-NPs的释药行为符合一级动力学模型，表现出良好的缓释效果，可以有效延长药物的释放时间[19]。

Table 1　Fitting results of the release kinetic models for Tan IIA/M-NPs in 0.5% SDS solution. M_t/M_∞: Accumulative release rate at time t; M_∞: Accumulative drug-release at time ∞; M_t: Accumulative drug-release at time t

Model	Regression equation	R^2
Zero order process	$M_t/M_\infty = 2.24\,t + 7.20$	0.881 4
First order process	$\ln(1-M_t/M_\infty) = -0.07\,t + 71.08$	0.922 5
Higuchi	$M_t/M_\infty = 4.48\,t^{1/2} + 7.2$	0.881 4
Peppas	$M_t/M_\infty = 7.04\,t^{0.66}$	0.911 8

3　Tan IIA/M-NPs细胞毒性实验

如图3A所示，Tan IIA浓度在0.1～100 μmol·L^{-1}，游离药物、空白纳米粒及载药纳米粒组均对巨噬细胞影响较小，细胞存活率均大于80%，表明Tan IIA/M-NPs对巨噬细胞无明显毒性，生物相容性良好。

4　Tan IIA/M-NPs的体外靶向性评价

以LPS刺激的RAW264.7细胞为模型，通过甘露糖修饰与非修饰制剂的细胞摄取实验以及甘露糖竞争性抑制实验，考察Tan IIA/M-NPs的体外炎性靶向性，结果见图3B。在DMEM处理 (control) 组中，甘露糖修饰的C6/M-NPs的平均荧光强度显著高于未修饰的C6/SS-NPs组 ($P < 0.001$)。在游离甘露糖竞争性抑制实验中，甘露糖的加入对C6/SS-NPs的细胞摄取无显著性差异，但C6/M-NPs组的细胞摄取量显著下降，这是因为游离甘露糖占据巨噬细胞表面一部分甘露糖受体[20]，进而降低了C6/M-NPs的靶向能力。进一步证实了甘露糖修饰可以增强纳米粒与巨噬细胞的相互作用，促进巨噬细胞靶向内化纳米粒。

5　Tan IIA/M-NPs对RAW264.7巨噬细胞中NO水平的调控作用

如图3C所示，与空白细胞相比，LPS刺激后显著升高巨噬细胞中NO的表达水平 ($P < 0.001$)，产生强烈的炎症反应；与LPS刺激细胞相比，经游离Tan IIA、Tan IIA/SS-NPs和Tan IIA/M-NPs组处理后细胞内NO的含量均下降，表明丹参酮IIA各给药组均能降低LPS引起的NO水平；而与Tan IIA相比，Tan IIA/SS-NPs、Tan IIA/M-NP显著增强了丹参酮IIA对炎性巨噬细胞NO的抑制作用，并且Tan IIA/M-NPs由于其甘露糖靶向和ROS响应的双功能性，Tan IIA/M-NPs的NO抑制作用更显著。

6　Tan IIA/M-NPs对炎性巨噬细胞中炎症因子分泌的抑制作用

如图3D、E所示，LPS刺激显著诱导RAW264.7巨噬细胞分泌促炎因子，与空白对照组相比，分别提高了

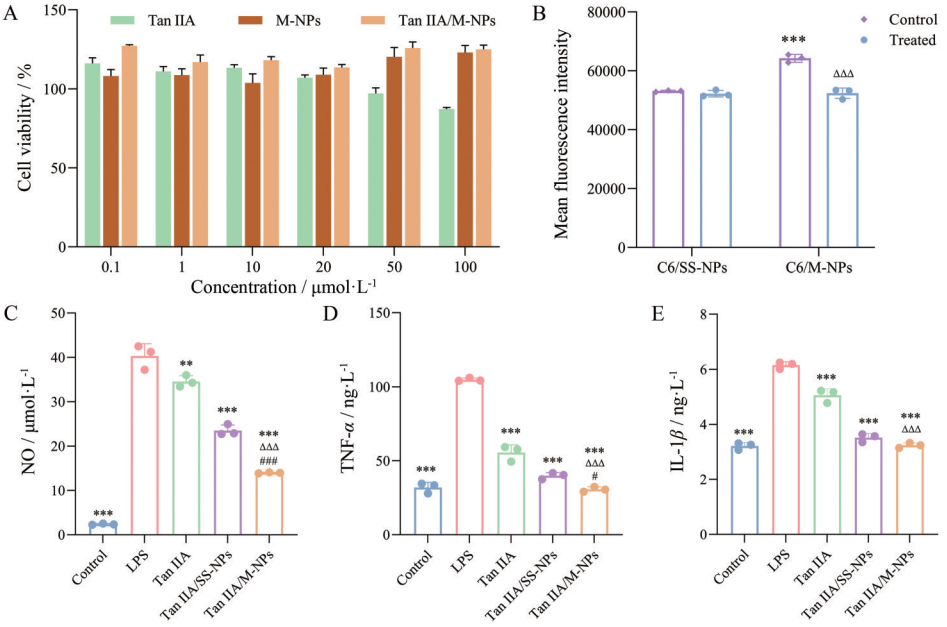


Figure 3　The functionality of Tan IIA/M-NPs in macrophages. A: Cytotoxicity of free drug, blank nanoparticles, and drug-loaded nanoparticles in RAW264.7 cells after incubation 24 h; B: Cellular uptake of C6/SS-NPs and C6/M-NPs in DMEM-treated (control) or LPS-stimulated (treated) RAW264.7 cells ($n = 3$, $\bar{x} \pm s$. $^{***}P < 0.001$ *vs* C6/SS-NPs group; $^{\triangle\triangle\triangle}P < 0.001$ *vs* control group); C−E: The levels of NO (C), TNF-α (D), and IL-1β (E) in LPS-stimulated RAW264.7 cells after incubation with Tan IIA, Tan IIA/SS-NPs, and Tan IIA/M-NPs. $n = 3$, $\bar{x} \pm s$. $^{**}P < 0.01$, $^{***}P < 0.001$ *vs* LPS group; $^{\triangle\triangle\triangle}P < 0.001$ *vs* Tan IIA group; $^{\#}P < 0.05$, $^{\#\#\#}P < 0.001$ *vs* Tan IIA/SS-NPs group

3.3、1.9倍; 与LPS组比, Tan IIA、Tan IIA/SS-NPs、Tan IIA/M-NPs预处理后均显著抑制TNF-α、IL-1β的分泌, 其中Tan IIA组中TNF-α水平降低至LPS组的53%左右, IL-1β降低至82%左右; 而与Tan IIA相比, Tan IIA/SS-NPs、Tan IIA/M-NPs对TNF-α与IL-1β抑制作用更加显著; 与Tan IIA/SS-NPs相比, Tan IIA/M-NPs对TNF-α有显著抑制作用, 但二者对IL-1β无显著性差异。结果表明, Tan IIA/M-NPs可以显著提高Tan IIA抑制炎性因子TNF-α、IL-1β分子, 阻断炎性信号传导, 抑制炎症级联反应、增强炎症消退。

7 Tan IIA/M-NPs对RAW264.7巨噬细胞极化的调控作用

巨噬细胞主要分为促炎的M1型细胞和抗炎的M2型细胞, 采用流式细胞术检测细胞中CD86和CD206水平, 考察Tan IIA/M-NPs对巨噬细胞极化调控作用。结果如图4所示, 其中Q1为$CD86^{-}CD206^{+}$ (M2型极化细胞群), Q3为$CD86^{+}CD206^{-}$ (M1型极化细胞群), 与control组相比, LPS刺激后巨噬细胞细胞以促炎M1表型为主; 与LPS组和丹参酮IIA比, Tan IIA/SS-NPs和Tan IIA/M-NPs处理后, $CD86^{+}CD206^{-}$ (Q3)比例降低、而$CD86^{-}CD206^{+}$ (Q1)比例增加, 表明Tan IIA/SS-NPs和Tan IIA/M-NPs均能够降低M1型巨噬细胞、增加M2型巨噬细胞含量, 将部分M1型巨噬细胞复极化为M2型巨噬细胞, 抑制炎性反应。

8 Tan IIA/M-NPs对RAW264.7巨噬细胞中ROS的清除作用

如图5所示, 与空白组相比, LPS刺激后RAW264.7细胞中的绿色荧光显著增强, 表明细胞内ROS水平显著增加; Tan IIA、Tan IIA/SS-NPs、Tan IIA/M-NPs处理后, 细胞中ROS含量明显降低, 其中Tan IIA/M-NPs对ROS的清除能力最强。本研究进一步证实双功能纳米粒能够提高Tan IIA在炎性巨噬细胞中的聚集, 降低

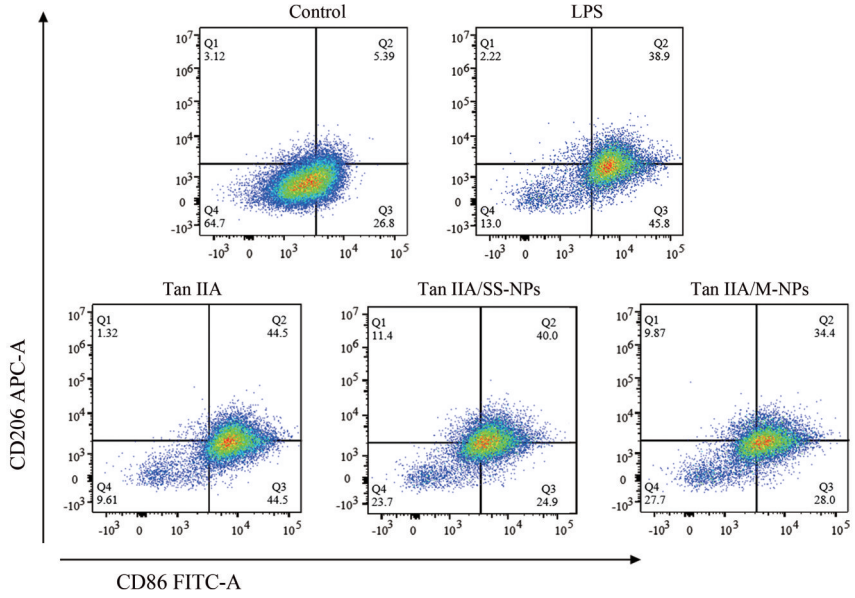


Figure 4 The levels of CD86 and CD206 in LPS-stimulated RAW264.7 cells treated with different formulations by flow cytometry

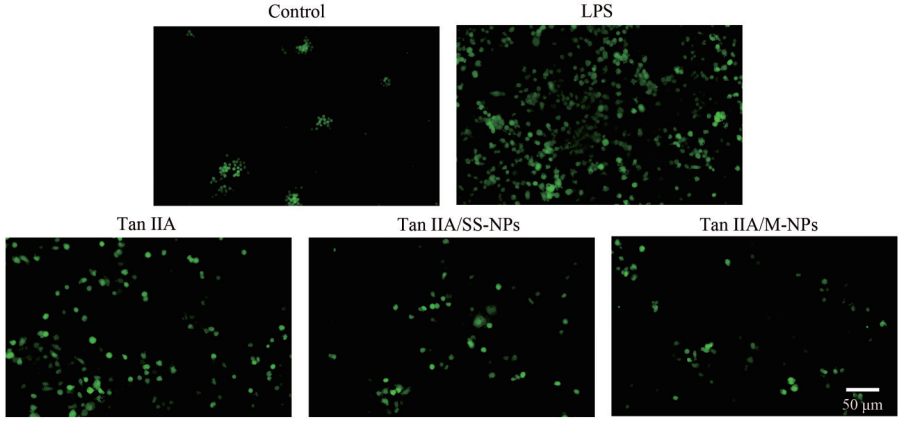


Figure 5 Images of Intracellular ROS in macrophages after different treatments (DCFH-DA, green) by inverted fluorescence microscope. (Scale bar = 50 μm)

细胞内ROS水平, 更好地发挥Tan IIA抗炎作用。

讨论

丹参酮IIA具有良好的心血管保护作用, 研究表明, 丹参酮IIA可以抑制炎症反应并促进巨噬细胞向M2表型极化[21]。鉴于抑制巨噬细胞中的过度炎症反应以及清除活性氧对于心肌细胞存活的重要性, 将丹参酮IIA递送到炎性心肌组织中的巨噬细胞可以有效保护心肌细胞[8]。为了提高丹参酮IIA对心肌梗死的治疗效果, 作者基于甘露糖对炎性巨噬细胞的靶向性以及二硫键对高ROS微环境的响应性, 设计了Tan IIA/M-NPs。

以聚乙二醇 (PEG) 作为亲水涂层, 减少纳米粒被血流中的单核巨噬细胞识别和清除[22]; 表面修饰的甘露糖配体介导纳米粒特异性靶向心肌梗死炎症处巨噬细胞上的甘露糖受体, 减少非特异性细胞摄取; 由于梗死部位心脏氧化还原稳态失衡, 纳米粒中的双硫键具有氧化敏感性, 在高ROS环境下可以发生响应性断裂, 进一步将Tan IIA递送到损伤部位。处方优化后制备的Tan IIA/M-NPs粒径为198.3 ± 2.8 nm, 具有良好的贮存稳定性, 甘露糖表面修饰密度可调。体外H_2O_2敏感性和释放实验证实了纳米粒的氧化敏感性, 在H_2O_2环境下二硫键被氧化成亲水性砜或亚砜, 结构中相邻酯键发生水解, 纳米粒中装载的Tan IIA释放速率增加[13]; CCK8实验表明, Tan IIA/M-NPs生物相容良好, 对巨噬细胞无明显毒作用, 且在一定程度上促进巨噬细胞活力增长[23], 为细胞实验给药剂量提供参考; 炎性巨噬细胞对Tan IIA/M-NPs摄取与纳米粒表面修饰的甘露糖有关; Tan IIA/M-NPs可显著降低LPS刺激的巨噬细胞中NO、TNF-α、IL-1β、ROS水平, 表明Tan IIA/M-NPs可以调控炎症因子的释放, 清除ROS, 改善心肌微环境, 进而缓解心肌炎症。

综上所述, 本研究制备的Tan IIA/M-NPs粒径较小且分散性良好, 可以增强Tan IIA对心肌炎症的抑制作用, 或能够有效抑制心肌梗死区域炎症的进展并促进其消退, 为丹参酮IIA治疗心肌梗死后炎症和修复提供新的研究思路。

作者贡献: 杨千年负责制剂制备表征、细胞毒性及细胞摄取实验与结果处理, 并负责文章撰写与修改; 王晓晖、李春、王金铃负责论文思路设计、实验指导与结果审核、文章修改与审核; 吕迎兰、董健藤负责炎症因子含量变化等细胞实验与结果处理; 刘雨菲负责制剂制备与文章修改; 刘雪梅负责文章修改。

利益冲突: 本文所有作者声明不存在利益冲突关系。

References

[1] Schirone L, Forte M, D'Ambrosio L, et al. An overview of the molecular mechanisms associated with myocardial ischemic injury: state of the art and translational perspectives [J]. Cells, 2022, 11: 1165.

[2] Kubota A, Frangogiannis NG. Macrophages in myocardial infarction [J]. Am J Physiol Cell Physiol, 2022, 323: C1304-C1324.

[3] Zhang Y, Jiang MT, Wang T. Reactive oxygen species (ROS)-responsive biomaterials for treating myocardial ischemia-reperfusion injury [J]. Front Bioeng Biotechnol, 2024, 12: 1469393.

[4] Peet C, Ivetic A, Bromage DI, et al. Cardiac monocytes and macrophages after myocardial infarction [J]. Cardiovasc Res, 2020, 116: 1101-1112.

[5] Xu SW, Xu C, Xu JH, et al. Macrophage heterogeneity and its impact on myocardial ischemia-reperfusion injury: an integrative review [J]. J Inflamm Res, 2023, 16: 5971-5987.

[6] Jian YH, Zhou X, Shan WJ, et al. Crosstalk between macrophages and cardiac cells after myocardial infarction [J]. Cell Commun Signal, 2023, 21: 109.

[7] Jung SH, Hwang BH, Shin S, et al. Spatiotemporal dynamics of macrophage heterogeneity and a potential function of Trem2^{hi} macrophages in infarcted hearts [J]. Nat Commun, 2022, 13: 4580.

[8] Hu DR, Li R, Li YC, et al. Inflammation-targeted nanomedicines alleviate oxidative stress and reprogram macrophages polarization for myocardial infarction treatment [J]. Adv Sci (Weinh), 2024, 11: e2308910.

[9] Li ZM, Xu SW, Liu PQ. *Salvia miltiorrhiza* Burge (Danshen): a golden herbal medicine in cardiovascular therapeutics [J]. Acta Pharmacol Sin, 2018, 39: 802-824.

[10] Ansari MA, Khan FB, Safdari HA, et al. Prospective therapeutic potential of tanshinone IIA: an updated overview [J]. Pharmacol Res, 2021, 164: 105364.

[11] Babadi D, Dadashzadeh S, Osouli M, et al. Biopharmaceutical and pharmacokinetic aspects of nanocarrier-mediated oral delivery of poorly soluble drugs [J]. J Drug Deliv Sci Technol, 2021, 62: 102324.

[12] Luo H, Lv Y, Gao HL, et al. Characterization of pathological blood-brain barrier crossing BSc3094 nanopreparations and evaluation of their targeting properties [J]. Acta Pharm Sin (药学学报), 2024, 59: 3388-3393.

[13] Li PC, Yang YR, Du YH, et al. Research progress of reactive oxygen speciesresponsive drug delivery systems in antiinflammatory therapy [J]. Prog Pharm Sci (药学进展), 2024, 48: 860-867.

[14] Cummings RD. The mannose receptor ligands and the macrophage glycome [J]. Curr Opin Struct Biol, 2022, 75: 102394.

[15] Fei WW, Wang XL, Guo J, et al. Design and investigation of targeting agent orientation and density on nanoparticles for

enhancing cellular uptake efficiency [J]. J Mater Chem B, 2023, 11: 8228-8240.

[16] Gu LY, Sun CW, Dong YH, et al. Optimization of formulation and *in vitro* evaluation of reactive oxygen species-responsive hyaluronic acid-modified podophyllotoxin nano-micelles [J]. Chin Tradit Herb Drugs (中草药), 2024, 55: 7663-7673.

[17] Gao FY, Liu XL, Peng S, et al. Rhamnose-analogues mediated liposomal drug delivery system for pancreatic cancer target therapy [J]. Acta Pharm Sin (药学学报), 2024, 59: 1067-1078.

[18] Kim C, Kim H, Sim WS, et al. Spatiotemporal control of neutrophil fate to tune inflammation and repair for myocardial infarction therapy [J]. Nat Commun, 2024, 15: 8481.

[19] Gan HQ, Mei CS, Guan ZY, et al. Preparation of Pueraria polysaccharides-loaded puerarin nanoparticles thermosensitive gel and its pharmacokinetics [J]. Chin Tradit Herb Drugs (中草药), 2024, 55: 7238-7247.

[20] Wang Y, Hou MY, Duan SZ, et al. Macrophage-targeting gene silencing orchestrates myocardial microenvironment remodeling toward the anti-inflammatory treatment of ischemia-reperfusion (IR) injury [J]. Bioact Mater, 2022, 17: 320-333.

[21] Gao S, Wang YL, Li D, et al. Tanshinone IIA alleviates inflammatory response and directs macrophage polarization in lipopolysaccharide-stimulated RAW264.7 cells [J]. Inflammation, 2019, 42: 264-275.

[22] Ma XB, Fan ZJ, Peng JY, et al. Ischemic area-targeting and self-monitoring nanoprobes ameliorate myocardial ischemia/reperfusion injury by scavenging ROS and counteracting cardiac inflammation [J]. Adv Sci (Weinh), 2025, 12: e2414518.

[23] Huang LQ, Shi XM, Wang JR, et al. Preparation and polarization activity research of astragalus polysaccharide-superparamagnetic iron oxide nanocomposite [J]. Acta Pharm Sin (药学学报), 2023, 58: 779-788.