

靶向动脉粥样硬化的重组高密度脂蛋白纳米递药系统的制备及性能评价

梁静, 计慧娟, 陈敬华, 高敏* (江南大学生命科学与健康工程学院, 江苏 无锡 214122)

摘要:目的 利用大肠杆菌表达 P-选择素靶向肽 (P-selectin binding peptide, PBP) 与载脂蛋白 A1 (apolipoprotein A1, ApoA1) 的融合蛋白 PBP-ApoA1, 将其制备获得包载姜黄素 (curcumin, Cur) 的重组高密度脂蛋白 (high-density lipoprotein, HDL) PA-rHDL-Cur, 用于动脉粥样硬化部位的靶向递药。方法 采用谷胱甘肽巯基转移酶 (glutathione S-transferase, GST) 标签共表达的策略实现 PBP-ApoA1 的可溶性表达, 将 PBP-ApoA1 纯化后与磷脂、胆固醇采用薄膜水化法包载姜黄素制备得到 PA-rHDL-Cur 载药纳米粒。利用粒度仪、紫外分光光度计表征其理化性质, 透析法分析其释药稳定性。体外细胞实验考察 PA-rHDL-Cur 的生物相容性和细胞摄取效率, 通过血小板黏附实验验证 PA-rHDL 对活化血小板的靶向性。探究 PA-rHDL-Cur 对 RAW264.7 巨噬细胞的抗氧化功能、胆固醇泵出效果和减少氧化型高密度脂蛋白的摄取能力。结果 通过摇瓶发酵和纯化 PBP-ApoA1 产量达 $1.33 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, PA-rHDL-Cur 大小均一, 粒径为 $(165.3 \pm 29.6) \text{ nm}$, Zeta 电位 $(-2.19 \pm 1.28) \text{ mV}$, 生物相容性较好。体外实验证实, PA-rHDL-Cur 可靶向到动脉粥样硬化病灶部位, 释放 Cur 降低病灶部位泡沫细胞内的氧化应激, 显著提高 Cur 的生物利用度。PA-rHDL 本身含有的 ApoA1 可通过胆固醇逆向转运促进胆固醇外排, 进而延缓动脉粥样硬化的发展进程。结论 本研究设计的仿生重组高密度脂蛋白纳米递药系统为开发抗动脉粥样硬化的新型纳米递送体系提供了设计思路与理论依据。

关键词:载脂蛋白 A1; 重组高密度脂蛋白; 融合蛋白; 动脉粥样硬化; 靶向递药

doi:10.11669/cpj.2024.21.007 中图分类号:R965 文献标志码:A 文章编号:1001-2494(2024)21-2042-11

Preparation and Performance Evaluation of Atherosclerosis Targeted Recombinant High-Density Lipoprotein Nano-Drug Delivery System

LIANG Jing, JI Huijuan, CHEN Jinghua, GAO Min* (School of Life Sciences and Health Engineering, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To express recombinant protein PBP-ApoA1 by fusion of P-selectin binding peptide (PBP) and apolipoprotein (ApoA1) by *Escherichia coli*, and PBP-ApoA1 was applied to further prepare a recombinant high-density lipoprotein (HDL) loading with curcumin (Cur), named PA-rHDL-Cur, for the effective treatment of atherosclerosis (AS) by targeting to activated platelets. **METHODS** The soluble expression of PBP-ApoA1 was achieved using a co-expression strategy with glutathione S-transferase (GST) tag. The purified PBP-ApoA1, phospholipid and cholesterol were encapsulated with Cur to prepare PA-rHDL-Cur by thin-film hydration method. The physicochemical properties of PA-rHDL-Cur were characterized by particle size analyzer and UV spectrophotometer, while the release stability was evaluated using dialysis method. Cell viability and cellular uptake efficiency of PA-rHDL-Cur were assessed *in vitro*. Platelet adhesion experiments were conducted to confirm the targeting ability of PA-rHDL towards activated platelets. Furthermore, the antioxidant activity, cholesterol efflux effect, and reduction in oxidized high-density lipoprotein uptake capacity of RAW264.7 macrophages treated with PA-rHDL-Cur were investigated. **RESULTS** The yield of PBP-ApoA1 obtained by shake flask fermentation and purification was $1.3 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$. The resulting PA-rHDL-Cur exhibited uniform particle size with an average diameter of $(165.3 \pm 29.6) \text{ nm}$ and the Zeta potential of $(-2.19 \pm 1.28) \text{ mV}$. The biocompatibility of this drug delivery system was satisfactory. *In vitro* cell experiments demonstrated that PA-rHDL-Cur effectively targeted atherosclerotic lesions, releasing curcumin to reduce oxidative stress within foam cells at the lesion site, significantly enhancing the bioavailability of Cur. Additionally, the presence of ApoA1 in PA-rHDL facilitated cholesterol efflux, thereby delaying the progression of atherosclerosis. **CONCLUSION** This design of biomimetic recombinant high-density lipoprotein nano-drug delivery system provides a new approach and theoretical basis for the development of novel nanocarriers against atherosclerosis.

KEY WORDS: apolipoprotein A1; recombinant high-density lipoprotein; fusion protein; atherosclerosis; targeted drug delivery

基金项目:国家自然科学基金项目资助(32101072); 江苏省自然科学基金项目资助(BK20210473)

作者简介:梁静, 女, 硕士研究生 研究方向: 药物递送 * 通讯作者: 高敏, 女, 博士, 副教授, 硕士生导师 研究方向: 药物递送
Tel: (0510)85911900

动脉粥样硬化 (atherosclerosis, AS) 是造成心血管疾病 (cardiovascular disease, CVD) 的最主要因素, 是危害我国人民生命安全的“头号杀手”之一。AS 作为一种慢性炎症性疾病, 起始于活化的血小板和内皮细胞, 活化的血小板高表达出 P-选择素 (P-selectin), 内皮细胞分泌多种细胞黏附因子, 二者共同促进白细胞滚动和血管内皮细胞黏附^[1]。单核细胞被招募到动脉内壁分化成巨噬细胞, 氧化型低密度脂蛋白 (oxidized low density lipoprotein, oxLDL) 诱导巨噬细胞成为脂质致密的泡沫细胞^[2]。病变后期, 凋亡的泡沫细胞与脂质核心一起演变为 AS 不稳定斑块。因此, 靶向 AS 斑块, 抑制斑块形成成为治疗 AS 重要靶点之一。

高密度脂蛋白 (high-density lipoprotein, HDL) 是血液中重要的脂蛋白^[3-4], 由中性甘油三酯和胆固醇酯组成的非极性疏水核心, 与磷脂、游离胆固醇和载脂蛋白组成的极性亲水外壳构成^[5-6]。HDL 可通过介导反向胆固醇转运将胆固醇从外周组织带回肝脏, 具有抗 AS 的功能^[7]。随着对 HDL 结构和功能研究的深入, 制备重组 HDL (recombinant high-density lipoprotein, rHDL) 作为药物递送载体, 用于心血管疾病的诊断与治疗已经成为研究热点^[8-9]。人工制备的 rHDL 作为仿生药物递送系统, 具有较大的空腔结构可以容纳不同类型和大小的药物^[10], 包括水溶性、脂溶性甚至是基因药物等^[11]。其较好的生物相容性和稳定性可以有效保护药物免受降解、代谢或清除^[12]。通过调整 rHDL 表面的成分和结构可以实现针对特定组织或细胞的靶向递送将药物精确地运送到目标区域^[13]。同时, 由于仿生 HDL 具有良好的生物相容性和降低不良反应的能力, 使用它作为药物递送载体可以减少药物对非靶标组织的不良反应^[14]。

载脂蛋白 A1 (apolipoprotein A1, ApoA1) 是 HDL 中最主要的结构和功能蛋白, 占 HDL 中蛋白总量的 70%^[15]。ApoA1 能够通过活化卵磷脂胆固醇酯酰基转移酶 (lecithin/cholesterol acyltransferase, LCAT) 产生治疗 AS 的作用。此外, ApoA1 是巨噬细胞中三磷酸腺苷结合盒转运体 A1 (ATP-binding cassette transporter A1, ABCA1) 的重要接受体, 能够诱导细胞内胆固醇流出^[16-17]。因此, ApoA1 是制备仿生 rHDL 必不可少的原料。目前, ApoA1 的常用制备方法是利用超速离心、有机萃取和高效液相等方法从人血清中分离提取, 这些方法虽然能得到高纯度的 ApoA1, 但明显存在制备量小、成本较

高、免疫原性等缺点^[18-19]。体外发酵表达 ApoA1 实现其高效生产并赋予其多功能性具有重要的研究与应用意义。通过基因工程技术在 ApoA1 上融合功能性的肽段或蛋白, 再将其整合到脂质纳米粒中形成的多功能仿生 rHDL 不仅是优异的药物递送载体, 其本身还具备泵出胆固醇等抗 AS 的活性作用。

P-选择素是表达在活化的血小板表面的一种黏附分子^[20], 静息状态的血小板不表达或低表达 P-选择素, 在炎症介质例如: 凝血酶、活性氧、肿瘤坏死因子等刺激下脱颗粒形成大量可溶性 P-选择素^[21]。P-选择素介导血小板黏附、聚集和活化, 促进炎症反应和血栓的形成, 从而加速 AS 斑块的形成^[22]。P-选择素靶向肽 (P-selectin binding peptide, PBP) 是一段能够特异性结合活化的血小板上 P-选择素的多肽, PBP 修饰的纳米粒对活化的血小板具有很强的结合能力^[23]。作为一种短肽, PBP 的生物安全性良好, 免疫原性与多糖或聚合物相比较低^[24-25], 因此, 用 PBP 修饰 HDL 作为心血管疾病的药物递送载体具有研究和临床转化意义。然而, 直接将 PBP 修饰 HDL 可能会造成 PBP 包封在磷脂双分子层而不暴露在外从而难以实现靶向的问题, 将 PBP 融合到 HDL 的关键组分 ApoA1 上, 在体外发酵表达融合蛋白既便于大规模生产又利用 ApoA1 插入 HDL 的天然特性及其空间结构使 PBP 暴露在 rHDL 表面。

基于上述背景, 本研究通过体外发酵表达融合 PBP 的 ApoA1 融合蛋白 (PBP-ApoA1), 并将纯化后的 PBP-ApoA1 与中性磷脂、胆固醇通过薄膜水化法制备靶向 P-选择素的重组高密度脂蛋白纳米粒 (PA-rHDL), 包载模型药物姜黄素 (curcumin, Cur)。Cur 通过抗炎、减少氧化应激、降脂、减少平滑肌细胞的增殖和迁移和保护内皮细胞等途径对抗 AS。然而, 与大多数的活性分子类似, Cur 的水溶性极差, 在碱性或中性环境中不稳定, 光、热和金属离子等易导致其失活。这些因素导致 Cur 在临床应用时生物利用度极低, 易在体循环过程中被清除。本研究使用 PA-rHDL 作为药物递送载体, 将 Cur 包载在脂质核心中, 改善 Cur 水溶性差、稳定性差、生物利用度低和代谢速率快等缺陷。通过将 Cur 靶向递送到 AS 斑块部位细胞内, 发挥其抗氧化、抗炎和稳定斑块细胞等治疗作用。最后, 评价载药体系 PA-rHDL-Cur 对 AS 部位的靶向性及治疗 AS 的效果 (图 1)。oxLDL 被巨噬细胞吞噬是 AS 发生的关键, Cur 可通过促进一氧化

2.1.2 融合蛋白 PBP-ApoA1 的发酵条件优化 发酵温度优化:挑取含有 PBP-ApoA1 基因的阳性单克隆接种于含终质量浓度为 $50 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的卡那霉素的 Luria-Bertani (LB) 液体培养基中,在 37°C 、 $220 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 的水平摇床培养 14 h 得到种子液。按体积分数 1% 接种量将种子液接种到 1 L 摇瓶中,继续以 37°C 、 $220 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 的条件在摇床培养 1 h 至 600 nm 波长处的吸光度值 (A_{600}) 约为 0.6,在摇瓶中加入终浓度为 $1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的异丙基- β -D-硫代半乳糖苷 (isopropyl- β -D-thiogalactoside, IPTG),分别置于 16、25、 37°C 摇床中发酵 14 h。

诱导剂浓度优化:用上述方法得到种子液并接种培养至 A_{600} 约为 0.6,在摇瓶中加入终浓度为 0.1、0.25、0.5、 $1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 IPTG 置于 37°C 摇床中发酵 14 h。

2.1.3 PBP-ApoA1 蛋白的纯化 谷胱甘肽巯基转移酶 (GST) 亲和层析纯化:将发酵后的菌体置于 GST 柱平衡缓冲液 ($140 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \text{ NaCl}$ 、 $10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \text{ Na}_2\text{HPO}_4$ 、 $1.8 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \text{ KH}_2\text{PO}_4$, pH 7.4),经超声破碎和冷冻离心获取上清液。随后,使用 AKTA 蛋白纯化仪,用 5 mL GSTCap 4FF 预装柱对上清液进行纯化。平衡 GST 柱后按流速 $1 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ 进样,结束进样后再次平衡 GST 柱,使用 GST 洗脱缓冲液 [$140 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \text{ NaCl}$ 、 $10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \text{ Na}_2\text{HPO}_4$ 、 $1.8 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \text{ KH}_2\text{PO}_4$ 、 $10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 谷胱甘肽 (GSH),pH 8.0],按紫外峰收集洗脱液,进行十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳 (Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE) 分析。将 GST-ApoA1 洗脱液使用磷酸盐缓冲溶液 (Phosphate buffer saline, PBS) 透析除去 GSH 以便于蛋白定量和后期的酶切操作。

凝血酶酶切 GST-PBP-ApoA1 蛋白:将 5、10、20 U 的凝血酶 (thrombin) 分别加入到 1 mL 经透析纯化的 1 mg GST-PBP-ApoA1 融合蛋白中,分别置于 25 和 37°C 中酶切 2 h,SDS-PAGE 检验酶切情况。

镍离子亲和层析纯化:首先用 Ni 柱 A 液 (平衡缓冲液 $500 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \text{ NaCl}$ 、 $20 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \text{ Na}_3\text{PO}_4$) 平衡柱,随后将酶切蛋白样品以 $1 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ 的流速进样,完成进样后再次平衡 Ni 柱。使用含体积分数 3% B 液 (洗脱缓冲液 $500 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \text{ NaCl}$ 、 $20 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \text{ Na}_2\text{CO}_3$ 、 $500 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 咪唑) 的缓冲液洗脱未结合的杂蛋白,最后通过 A、B 液混合线性洗脱获得去除 GST 标签的目的蛋白 PBP-ApoA1,根据 $\text{UV}_{280 \text{ nm}}$ 出峰位置收集纯化后的 PBP-ApoA1。通过

SDS-PAGE 检验蛋白纯化情况。

2.2 PA-rHDL-Cur 的制备与理化表征

2.2.1 PA-rHDL-Cur 的制备 利用薄膜水化法^[28] 制备 rHDL:精密称取 DOPC、Chol、DSPE-PEG₂₀₀₀ (摩尔比 = 5:3:1) 共 24 mg 溶于二氯甲烷中, Cur 2 mg 溶于二氯甲烷中,充分混匀后在 25°C 水浴中减压缓慢旋蒸除去有机溶剂,得到干燥均匀的脂质薄膜。加入 2 mL 质量浓度为 $1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的 PBP-ApoA1 水化磷脂双分子层,超声后离心并用 $0.22 \mu\text{m}$ 水系滤膜过滤除去未包载的 Cur,即得到载药重组高密度脂蛋白 PA-rHDL-Cur。由 ApoA1 制备的重组高密度脂蛋白 A-rHDL-Cur 和 A-rHDL 方法同上。对于荧光标记的 rHDL 使用终浓度为 $20 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ Cy5 荧光染料 (Sulfo-Cyanine5, Cy5) 或罗丹明代替 Cur。不含有 ApoA1 的对照组脂质体命名为 LNP,制备方法与上述方法相同,水化介质为 PBS 溶液。

2.2.2 PA-rHDL-Cur 的粒径和 Zeta 电位 将 ApoA1、LNP、PA-rHDL 和 PA-rHDL-Cur 稀释至 $0.1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$,采取动态光散射 (dynamic light scattering, DLS) 测量蛋白和纳米粒子的水力学粒径和 Zeta 电位。将制备的 PA-rHDL-Cur 放置于室温下,分别在 1、2、5、10 d 测量其粒径,用于监测 PA-rHDL-Cur 的稳定性。

2.2.3 PA-rHDL-Cur 包封率与载药率的测定 精密量取 PA-rHDL-Cur 混悬液适量 (约相当于 Cur 1 mg),用紫外分光光度法测定 PA-rHDL-Cur 负载 Cur 的量。通过测定样品和标准品最大吸收波长 420 nm 的紫外吸收值并建立标准曲线,按照公式 1~2 计算载药量 (loading content, LC) 和包封率 (entrapment efficiency, EE)。

$$\text{LC} (\%) = m1/m2 \times 100\% \quad \text{公式(1)}$$

$$\text{EE} (\%) = m1/m3 \times 100\% \quad \text{公式(2)}$$

$m1$ 表示 PA-rHDL-Cur 中所含 Cur 的质量, $m2$ 为 PA-rHDL-Cur 的质量, $m3$ 为制备脂质体时 Cur 的投料量。

2.2.4 PA-rHDL-Cur 的体外药物释放 采用动态透析法考察 PA-rHDL-Cur 的体外释药特性。精密量取 PA-rHDL-Cur 混悬液适量 (相当于 Cur 1 mg),置于透析袋中 (截留相对分子质量 3 500),将透析袋置于含 0.2% Tween 20、25% 乙醇的 PBS (pH = 7.0) 20 mL 中,在 37°C 、 $100 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 水浴震荡,分别于 0.5、1、2、3、4、6、8、12、24、36、48、60、72 h 取样 2 mL,同时补加同体积释放介质。各时间点样品使用紫外分光光度计在 420 nm 处测量吸光度并计算

药物释放量。

2.3 PA-rHDL-Cur 的生物相容性与细胞摄取情况

2.3.1 细胞毒性测定 通过 MTT 法测定 PA-rHDL-Cur 对 RAW264.7 巨噬细胞和 HUVECs 静脉内皮细胞的细胞毒性。2 种细胞的处理方法相同,具体操作为:取生长状态良好的细胞制成均匀的细胞悬液,在 96 孔板中以每孔 5×10^3 个的细胞密度接种。取制备的 PA-rHDL-Cur,使用 $0.22 \mu\text{m}$ 滤膜过滤除菌。用 DMEM 培养基将 PA-rHDL-Cur 稀释至一系列质量浓度:0、0.05、0.1、0.25、0.5、 $1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。待细胞贴壁后,用配置好的不同浓度的 PA-rHDL-Cur 溶液处理细胞 24 h。培养 24 h 后,弃去培养液,每孔加入含终质量浓度为 $0.5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ MTT 的培养液,继续培养 4 h。随后,吸去培养液,每孔加入 $100 \mu\text{L}$ 二甲基亚砜(DMSO),置于摇床上以 $50 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 低速振荡 20 min,使甲瓚结晶充分溶解。最后,用酶标仪在 570 nm 处测定各个样品孔的吸光度值,并计算细胞存活率用于反映活细胞数量和细胞增殖能力。

2.3.2 细胞摄取实验 将 RAW264.7 细胞按照每皿 1×10^5 个的密度接种在 35 mm 共聚焦皿中,培养箱中孵育 24 h。待细胞贴壁后,吸去培养基,用 PBS 洗涤 3 次,加入含 Cy5 标记的 PA-rHDL 至终质量浓度为 $0.2 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的 DMEM 培养基,分别孵育 2、4、6、8 h。弃去培养基,用 PBS 洗涤 3 次,加入 1 mL 质量分数 4% 多聚甲醛室温固定 20 min。弃去多聚甲醛,用 PBS 洗涤 3 次后用 1 mL 4',6-二脒基-2-苯基吲哚(4',6-diamidino-2-phenylindole, DAPI) 染色 20 min。最后,弃去染料后用 PBS 洗涤 3 次,加入 $100 \mu\text{L}$ PBS,在激光共聚焦显微镜(confocal laser scanning microscope, CLSM)下捕获细胞的荧光成像图像。对于流式细胞仪定量检测摄取率的测试,将 RAW264.7 细胞按照每孔 1×10^4 个的密度接种在 12 孔板中,培养 24 h 待细胞贴壁后弃去培养基加入质量浓度为 $0.2 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的含 Cy5 标记的 PA-rHDL DMEM 培养液,分别孵育 2、4、6、8 h。随后,用胰酶消化细胞,离心弃去胰酶,PBS 清洗 3 次后,用 1 mL PBS 重悬细胞成单细胞悬液并在流式细胞仪下收集单细胞上的荧光信号,评估细胞摄取情况。

2.4 靶向性测试

取小鼠全血 1 mL,室温条件下 $200 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 10 min 后取上层清液,再将上层清液 $1200 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 5 min 后弃去上层液体,底部白色沉淀即为血小板。使用 PBS 重悬,计数后向

96 孔板每孔加入 1×10^7 个血小板,在 $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 培养箱中孵育 1 h 使血小板贴壁。随后每孔加入 0.1 U 的凝血酶, $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 孵育 15 min 将血小板激活。使用活化的罗丹明偶联 PBP-ApoA1 和 ApoA1, rHDL 在水化过程中加入等量罗丹明,使用透析法除去游离的罗丹明。随后向活化的血小板中加入 $100 \mu\text{L}$, $0.1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的蛋白或脂质体, $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 孵育 2 h 后在荧光显微镜下观察血小板靶向作用,并用流式定量检测荧光强度。

2.5 PA-rHDL-Cur 的治疗效果评价

2.5.1 PA-rHDL-Cur 抗氧化能力测定 将 RAW264.7 细胞按照每皿 1×10^5 个的密度接种在 35 mm 共聚焦皿中,培养箱中孵育 24 h,再使用 $100 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)处理 RAW264.7 细胞 24 h 构建泡沫细胞模型。随后,加入 $0.1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的游离的 Cur、PA-rHDL 和 PA-rHDL-Cur 处理细胞 24 h。最后,将终浓度为 $1 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ C11 BODIPY 581/591 荧光探针加入处理完成的细胞,置于 $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 培养箱孵育 30 min, PBS 清洗 3 遍,再加入 1 mL 质量分数 4% 多聚甲醛室温固定 20 min 并用 1 mL DAPI 染色 20 min。用 PBS 洗涤 3 次后在激光共聚焦显微镜下捕获细胞的荧光成像图像。

2.5.2 PA-rHDL 的胆固醇转运作用评价 将 RAW264.7 细胞按每孔 1×10^5 个的密度接种在 6 孔板中,置于培养箱中培养 24 h。待细胞贴壁后,弃去培养基,用 PBS 洗涤 3 次,加入含 0.05、 $0.2 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ PA-rHDL 的培养基置于细胞培养箱培养,对照组加入等量 PBS。孵育 24 h 后,加入胰酶消化每组细胞,PBS 清洗并计数,参照总胆固醇(total cholesterol, TC) 含量检测盒说明书上的操作测定细胞内胆固醇含量。

2.5.3 巨噬细胞对 oxLDL 的摄取情况 将 RAW264.7 细胞按每孔 5×10^3 个的密度接种到 12 孔板中,培养箱中孵育 24 h,待细胞贴壁后加入 $0.1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的游离的 Cur、PA-rHDL 和 PA-rHDL-Cur 处理细胞 24 h, Ctrl 组加入等量 PBS。随后,加入 oxLDL $50 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 处理细胞 24 h,按照碧云天油红 O 染色试剂盒说明书进行染色,并通过显微镜拍摄图像。

2.6 数据处理与分析

本研究中检测数据以均数 \pm 标准差表示,数据分析运用 SPSS 23.0 软件,显著性分析使用 *t* 检验,以 $P < 0.05$ 为具有统计学差异,运用 GraphPad Prism 8 绘制统计图。

3 结果

3.1 PBP-ApoA1 的质粒构建、表达与纯化

按照“2.1.1”项下方法构建质粒 pGEX-4T-1-[ApoA1] 与 pGEX-4T-1-[PBP-ApoA1], 并将重组质粒转化到 BL21 (DE3) 中菌株中利用通用引物进行菌落 PCR 鉴定, 结果见图 2A, 在 900 ~ 1 000 bp 附近出现单一条带, 与 ApoA1、PBP-ApoA1 预期条带 911 和 944 bp 位置一致。实验通过菌落 PCR 并结合测序数据验证了工程菌 BL21 (DE3)/pGEX-4T-1-[ApoA1] 与 BL21 (DE3)/pGEX-4T-1-[PBP-ApoA1] 的成功构建。

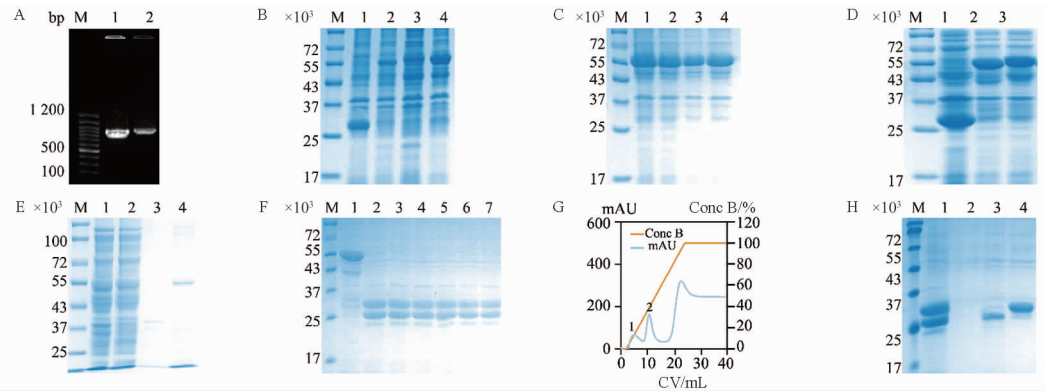
按照“2.1.2”中实验步骤分别在 16、25、37 °C 不同温度条件下诱导发酵 14 h, 发酵结束后将 3 组菌液 A_{600} 稀释至一致, 破碎后取上清液, 使各组样品总蛋白含量一致用于 SDS-PAGE 检测蛋白发酵情况。实验结果见图 2B, 不含目的基因的空质粒组 (泳道 1) 在 26 000 表达出 GST 标签蛋白, 不同温度条件下在约 57 600 (GST-PBP-ApoA1) 处均有明显条带, 表明在 3 种温度条件下蛋白表达载体均能表达出重组蛋白 GST-PBP-ApoA1。ApoA1 在常规 pET 系列质粒中常常以包涵体形式表达, 破碎后上清液中所含目的蛋白很少。因此, GST 标签的融合增加了可溶性融合蛋白 GST-PBP-ApoA1 的表达量, 并且随着温度的升高, GST-PBP-ApoA1 的表达量显著提升, 因此, 实验将 37 °C 作为表达的最佳诱导温度。同样方法改变加入终浓度为 0.1、0.25、0.5、1 mmol · L⁻¹ 的一系列不同 IPTG 浓度, 其他条件保持一致, 继续发酵 14 h。SDS-PAGE 结果见图 2C, 各组目的蛋白表达量相近, 说明 IPTG 浓度对目的蛋白表达的影响较小, 为减少 IPTG 毒性和发酵成本, 实验选择诱导剂终浓度为 0.1 mmol · L⁻¹。按照上述优化的诱导条件发酵, 1 L 培养基可以发酵得到湿重约 4.16 g 的菌体。SDS-PAGE 测定菌体破碎后离心的上清液, 即可溶性表达蛋白, GST-ApoA1 和 GST-PBP-ApoA1 主要以可溶形式表达在上清液中, 表达条件优化后获得了高表达量的可溶性目标蛋白 (GST-ApoA1 和 GST-PBP-ApoA1), 见图 2D。实验证实 GST 标签的引入能够帮助 PBP-ApoA1 在表达过程中正确折叠, 避免因不正确折叠而形成不溶性包涵体, 提升 ApoA1 的水溶性。

利用 AKTA 蛋白纯化系统先经 GST 亲和层析进行第一步纯化获得 GST-PBP-ApoA1 蛋白。菌体破碎后离心得到上清液中的可溶性蛋白经纯化后在

57 600 左右出现单一条带, 表明通过 GST 亲和柱层析成功纯化出 GST-PBP-ApoA1 (图 2E)。随后, 将纯化后的 GST-PBP-ApoA1 融合蛋白经凝血酶处理并验证融合蛋白上 GST 标签是否能被切除。结果见图 2F, 经凝血酶处理后的蛋白溶液中含有大小分别为 26 000 和 31 400 的两条条带, 与 GST 标签断裂蛋白和 PBP-ApoA1 蛋白大小一致。该实验结果表明, 在 25 °C, 5 U 的凝血酶酶切 2 h 可以完全切开 1 mg 的融合蛋白, 因此, 选择该条件作为酶切反应条件。酶切后的蛋白通过镍柱进行第二步纯化以获得 PBP-ApoA1 蛋白, 见图 2G 和 2H, 通过线性洗脱后 26 000 的 GST 标签蛋白首先洗脱出峰 (Peak1), 随后目的蛋白 PBP-ApoA1 被含有高咪唑的洗脱缓冲液洗脱出峰 (Peak2), 在 314 000 处出现单一条带。GST 亲和层析和镍离子亲和层析两步纯化可以得到高纯度的可溶性 PBP-ApoA1, 1 L 培养基可纯化获得约 400 mg 的纯蛋白。实验通过生物发酵的方法实现了 PBP-ApoA1 的高效生成, 为制备 rHDL 提供了主要活性原料。

3.2 PA-rHDL-Cur 的理化表征和体外释药特性

通过紫外分光光度法计算得 PA-rHDL-Cur 中 Cur 的封装率为 86.3%, 载药量为 1.6%。采用纳米粒度仪分别对 PBP-ApoA1、LNP、PA-rHDL 及 PA-rHDL-Cur 进行粒径与表面电位的测定, 结果见图 3A 和 3B。PBP-ApoA1 的等电点为 6.50, 在 pH 7.4 的中性 PBS 介质中理论上带负电荷, 纳米粒度仪测得的 Zeta 电位为 (-4.6 ± 0.3) mV, 与理论一致。使用非阳离子脂质制备的 LNP 对照组几乎不带电, 而 PA-rHDL 与 PA-rHDL-Cur 电位分别为 (-1.5 ± 1.3) (-2.2 ± 1.3) mV, 这一现象也表明了制备的 PA-rHDL 和 PA-rHDL-Cur 含有 PBP-ApoA1。从粒径数据来看, PBP-ApoA1 蛋白的粒径为 (5.4 ± 2.2) nm; LNP 与 PA-rHDL 纳米粒的粒径相似, 分别为 (137.7 ± 25.9) (138.5 ± 23.7) nm; 负载 Cur 之后的 rHDL 粒径增大变为 (165.3 ± 29.6) nm。这种带负电荷的小于 200 nm 尺寸的纳米粒适宜作为药物递送载体用于心血管疾病, 因为带负电荷的纳米粒能够与血液中的凝血因子相互作用, 抑制血小板聚集和凝血过程, 从而减少血栓形成的风险。这种静电吸附有助于保持纳米粒的结构完整性, 并增加其在血液中的循环时间。与正电荷纳米粒相比, 带负电荷的纳米粒在血液循环过程中降低了与细胞和非特异性相互作用。这有助于减少潜在的毒性和副作用, 提高



A - 菌落 PCR 鉴定重组质粒转化的基因工程菌:泳道 1 - ApoA1, 泳道 2 - PBP-ApoA1; B - SDS-PAGE 分析不同温度对 PBP-ApoA1 的表达的影响:泳道 1 - BL21 (DE3)/pGEX-4T-1, 泳道 2~4 - BL21 (DE3)/pGEX-4T-1-[PBP-ApoA1] 分别在 16, 25, 37 °C 上清液; C - SDS-PAGE 分析不同 IPTG 浓度诱导下对 PBP-ApoA1 表达的影响:泳道 1~4 - 0.1, 0.25, 0.5, 1 mmol · L⁻¹ IPTG; D - GST-PBP-ApoA1 与 GST-ApoA1 的表达情况:泳道 1 - BL21 (DE3)/pGEX-4T-1, 泳道 2 - BL21 (DE3)/pGEX-4T-1-[ApoA1], 泳道 3 - BL21 (DE3)/pGEX-4T-1-[PBP-ApoA1]; E - SDS-PAGE 分析镍柱纯化结果:泳道 1 - 全菌, 泳道 2 - 细菌破碎上清液, 泳道 3 - 流穿液, 泳道 4 - GST-PBP-ApoA1; F - 凝血酶酶切结果:泳道 1 - GST-PBP-ApoA1, 泳道 2~4 - 5, 10, 20 U 凝血酶在 25 °C 酶切 2 h, 泳道 5~7 - 5, 10, 20 U 凝血酶在 37 °C 酶切 2 h; G - 蛋白纯化曲线; H - GST 柱纯化结果:泳道 1 - 凝血酶处理后产物, 泳道 2 - 流穿液, 泳道 3 - GST, 泳道 4 - PBP-ApoA1。

A - PCR amplification for the identification of gene engineering bacteria transformed with recombinant plasmid; lane 1 - ApoA1, lane 2 - PBP-ApoA1; B - the effect of different temperatures on the expression of PBP-ApoA1 examined by SDS-PAGE; lane 1 - BL21 (DE3)/pGEX-4T-1 fermentation bacteria liquid, lane 2 - 4 - BL21 (DE3)/pGEX-4T-1-[PBP-ApoA1] fermentation bacteria liquid at 16, 25, 37 °C; C - The effect of IPTG concentration on the expression of expression of PBP-ApoA1 examined by SDS-PAGE; Lane 1 - 4 - 0.1, 0.25, 0.5, 1 mmol · L⁻¹ IPTG; D - The expression of GST-PBP-ApoA1 and GST-ApoA1; Lane 1 - BL21 (DE3)/pGEX-4T-1, Lane 2 - BL21 (DE3)/pGEX-4T-1-[ApoA1], Lane 3 - BL21 (DE3)/pGEX-4T-1-[PBP-ApoA1]; E - the results of purification by nickel column analyzed by SDS-PAGE (lane 1 - the bacteria lysate; lane 2 - supernatant of the bacteria lysate; lane 3 - flow through; lane 4 - GST-PBP-ApoA1); F - results of thrombin digestion; lane 1 - GST-PBP-ApoA1, lane 2 - 4 - the recombinant protein was digested by 5, 10, 20 U thrombin for 2 h at 25 °C, lane 5 - 7 - the recombinant protein was digested by 5, 10, 20 U thrombin for 2 h at 37 °C; G - fusion protein purification curves; H - results of GST column purification; lane 1 - unpurified mixture of GST and PBP-ApoA1 after enzyme digestion, lane 2 - flow through, lane 3 - GST, lane 4 - PBP-ApoA1.

图 2 PBP-ApoA1 的质粒构建、表达与纯化

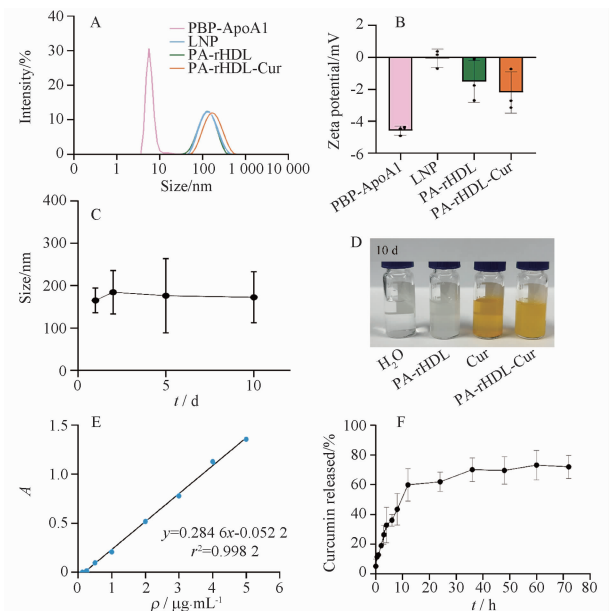
Fig. 2 Plasmid construction, expression and purification of PBP-ApoA1

纳米粒作为药物载体的安全性。研究监测了 PA-rHDL-Cur 在 10 d 内的粒径变化, 实验数据表明其粒径未发生明显变化, 稳定在 160 ~ 180 nm 范围 (图 3C), 放置 10 d 后游离 Cur 出现明显沉淀, 而 PA-rHDL-Cur 和 PA-rHDL 仍旧澄清 (图 3D)。实验结果表明 PA-rHDL 载体可以提升 Cur 的稳定性。

PA-rHDL-Cur 在 72 h 内的释放曲线见图 3F, Cur 在 2 h 的释放量大约为 (19.1 ± 1.3)%, 在 12 h 时的释放量约 (60.0 ± 10.9)%, 24 h 内累计释放达 (62.0 ± 6.5)%, 72 h 内达到 (72.1 ± 7.8)%。这表明制备的重组高密度脂蛋白能够较好地包载 Cur, 延缓了 Cur 的释放, 避免了药物突释, 使药物能够持续发挥药效。这也表明重组高密度脂蛋白是递送 Cur 的良好载体。

3.3 PA-rHDL-Cur 的生物相容性与体外摄取效率

在 AS 微环境中, 巨噬细胞和内皮细胞是 AS 病程中起主要作用的细胞。本研究首先通过 MTT 法检测了 PA-rHDL-Cur 对 RAW264.7 巨噬细胞和 HUVECs 静脉内皮细胞的毒性以考察其生物相容性。实验结果 (图 4A、4B) 显示, PA-rHDL-Cur 质量浓度在 1 mg · mL⁻¹ 时仍未对两种细胞产生明显的



A - 粒径; B - 电位; C - PA-rHDL-Cur 粒径变化; D - PA-rHDL-Cur 储存 10 d 后的外观图; E - Cur 的标准曲线; F - PA-rHDL-Cur 的药物释放曲线。

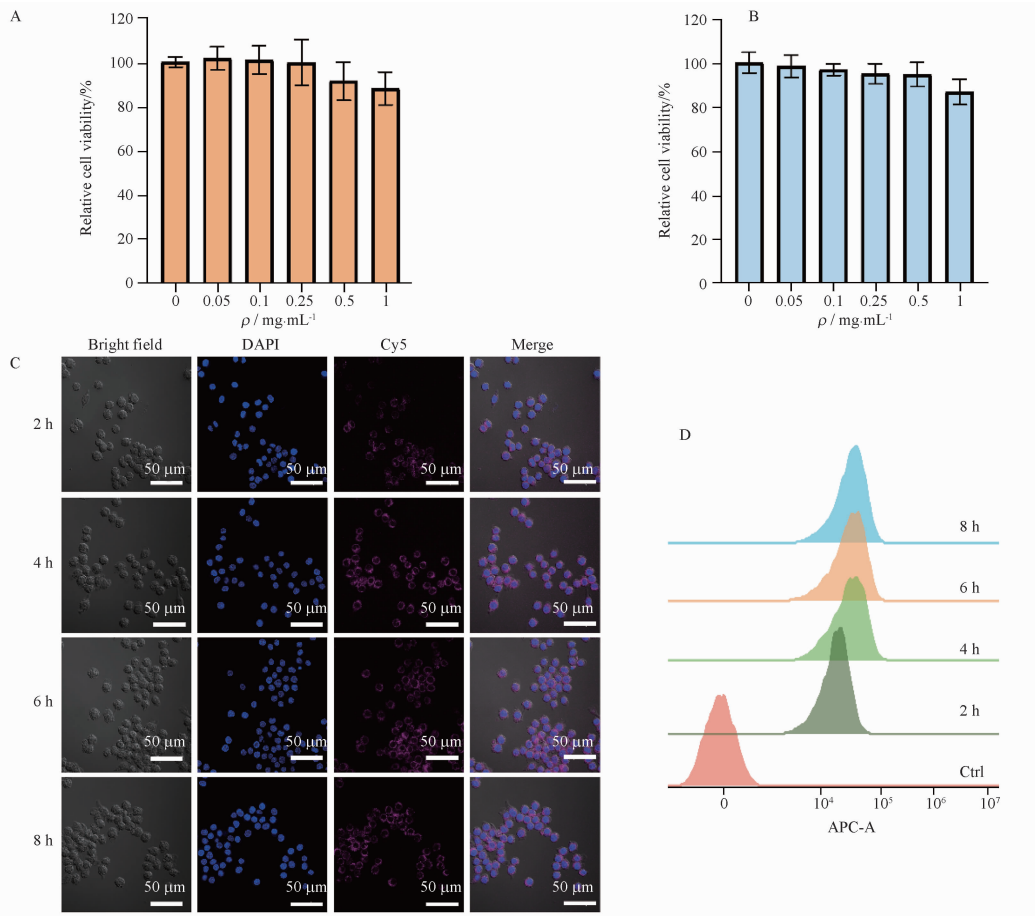
A - hydrodynamic sizes; B - Zeta potentials; C - the size variation of PA-rHDL-Cur; D - appearance of samples at different storage times; E - standard curve of Cur; F - cumulative release profile of Cur from PA-rHDL-Cur.

图 3 PA-rHDL-Cur 的理化性质和体外释药特性。n = 3, $\bar{x} \pm s$
Fig. 3 Physicochemical properties and *in vitro* release profile of PA-rHDL-Cur. n = 3, $\bar{x} \pm s$

毒性,细胞存活率均高于 80%,说明 PA-rHDL-Cur 具有良好的生物安全性。

药物发挥作用的关键是能够被细胞有效摄取,为了探究 AS 斑块部位细胞对 PA-rHDL 的摄取能力,本研究使用 Cy5 标记的 PA-rHDL 与 RAW264.7 细胞共孵育 2~8 h,通过激光共聚焦显微镜观察细胞内的荧光强度来考察细胞对 PA-rHDL 的摄取效率。结果见图 4C,PA-rHDL 处理 2 h 后,RAW264.7

细胞内即出现大量荧光,说明 PA-rHDL 能够被细胞快速摄取。流式细胞术检测结果与激光共聚焦显微镜结果一致,与未给药的 Ctrl 组相比,2 h 后 RAW264.7 细胞开始摄取 PA-rHDL,随着孵育时间的延长,荧光强度逐渐增强,说明更多的 PA-rHDL 进入细胞。这一实验现象可能是由于 PA-rHDL 中的磷脂成分与细胞膜成分接近,可以通过膜融合的方式快速进入细胞进而提高细胞对药物的摄取效率。



A - PA-rHDL 对 RAW264.7 细胞活力的影响; B - PA-rHDL 对 HUVECs 细胞活力的影响; C - RAW264.7 细胞摄取 PA-rHDL 的 CLSM 图像 (标尺 = 50 μm); D - 流式细胞术检测 PA-rHDL 处理 RAW264.7 细胞不同时间点的荧光强度。

A - the cell viability of RAW264.7 cells with the treatment of PA-rHDL; B - the cell viability of HUVECs cells with the treatment of PA-rHDL; C - CLSM images of RAW264.7 cells incubated with PA-rHDL by recording Cy5 fluorescence (scale bar = 50 μm); D - the fluorescent intensities of RAW264.7 cells with Cy5-labeled PA-rHDL treatment detected by flow cytometry at different time intervals.

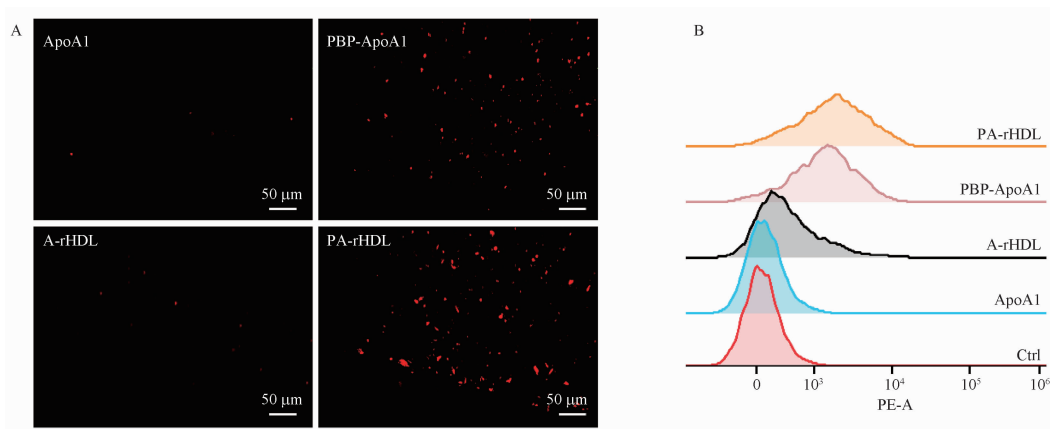
图 4 MTT 法检测细胞活力与 PA-rHDL 的体外细胞摄取情况。 $n = 3, \bar{x} \pm s$

Fig. 4 Cell viability examined via MTT assays and intracellular uptake of Cy5-labeled PA-rHDL by RAW264.7 cells. $n = 3, \bar{x} \pm s$

3.4 PA-rHDL 的血小板靶向作用

由图 5A 可见,与 ApoA1 组相比,含有 PBP 样品的组别中红色荧光点明显增多,说明 PBP 的引入使更多的样品黏附在活化的血小板上。利用流式细胞仪进行定量检测,实验结果表明 PBP-ApoA1 处理的血小板荧光强度较 ApoA1 增强了 34.7%。将 PBP-

ApoA1 插入到 rHDL, PBP 更容易暴露在纳米粒表面,单个 rHDL 含有多个 PBP-ApoA1 显著增强了 PA-rHDL 的靶向作用。PA-rHDL 与不具有靶向功能的 A-rHDL (即采用不含 PBP 的 ApoA1 制备的 rHDL) 平均荧光强度增加了 47.2%。实验结果表明, PBP 的引入赋予了载体靶向性,制备的 PA-rHDL



A - 荧光显微镜观察活化的血小板图像 (标尺 50 μm); B - 流式细胞术检测活化血小板的荧光强度。

A - the images of activated platelets observed by fluorescent microscope (scale bar = 50 μm); B - the fluorescent intensities of activated platelets detected by flow cytometry.

图5 PA-rHDL 的血小板靶向作用

Fig. 5 *In vitro* platelet-targeting effects of PA-rHDL

具有 AS 斑块部位的能力。

3.5 PA-rHDL-Cur 对 AS 的疗效

研究最后通过评价 PA-rHDL-Cur 对氧化型活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 的清除能力、胆固醇转运能力以及抑制 oxLDL 能力来考察其对 AS 的疗效。首先,使用 C11 BODIPYTM 581/591 探针检测 LPS 造模的泡沫细胞模型中氧化型 ROS 的水平来评价模型药物 Cur 包载在 PA-rHDL 中发挥抗氧化作用的效果。游离 Cur 因其较差的水溶性而被细胞摄取的较少,代表氧化型 ROS 的绿色荧光较强,ROS 清除能力较弱;重组仿生高密度脂蛋白负载 Cur (PA-rHDL-Cur) 后,因其靶向性及膜融合性将大量的 Cur 递送到细胞内进而发挥清除 ROS 的抗氧化作用,氧化型 ROS 的绿色荧光强度显著降低 (图 6A、6B)。研究结果表明,活性纳米载体 PA-rHDL 能够递送药物分子进入细胞并释放药物发挥其作用。

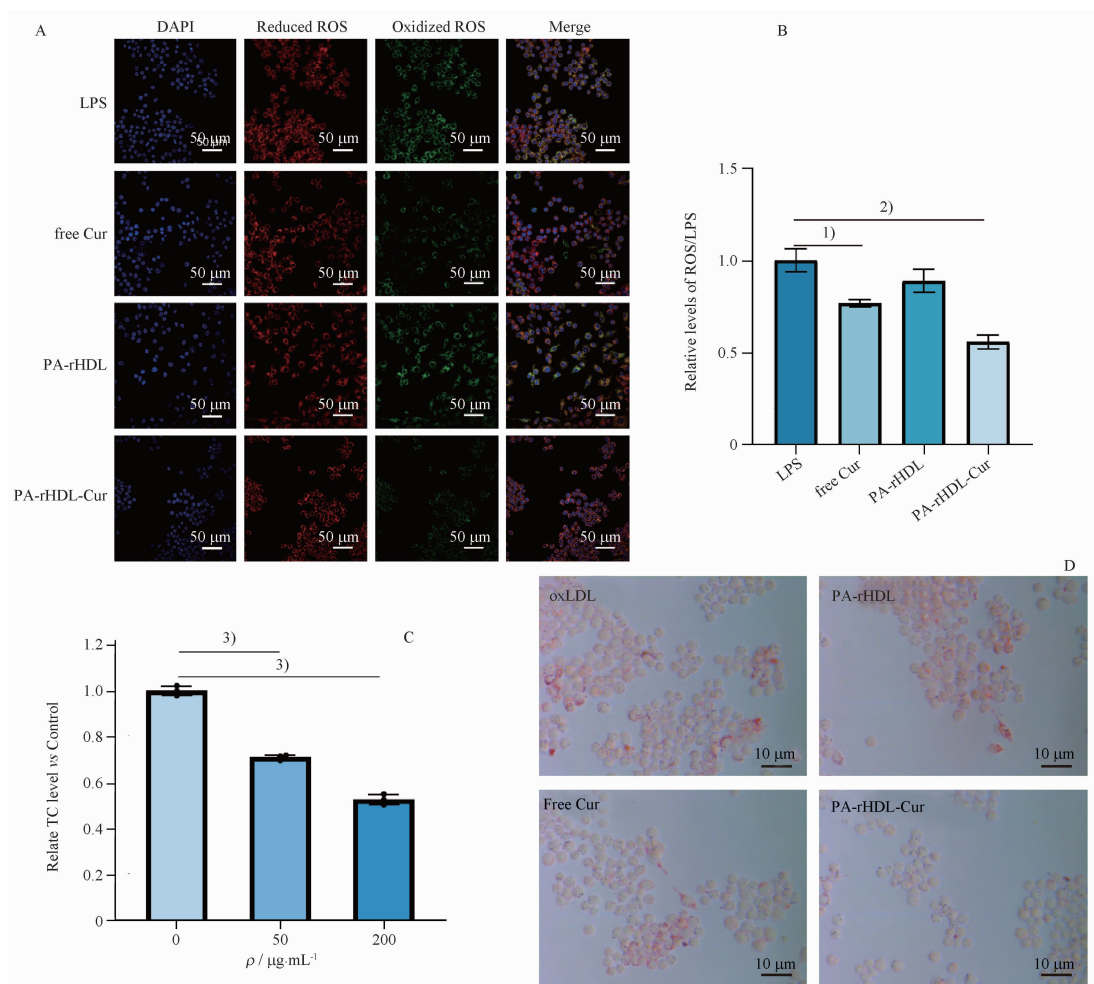
水溶性较差的磷脂、三酰甘油和胆固醇不能够在血液中直接运输,也不能直接进入组织,ApoA1 能够启动反向转运机制,从外周组织和血管壁中收集多余的胆固醇等,并通过 LCAT 转化成胆固醇酯,将其运送回肝脏进行代谢和排泄,从而减少 AS 的风险。此外,ApoA1 还能促进胆固醇的外排,它能够与肝细胞内的特定受体结合,刺激肝细胞对胆固醇的摄取和排泄,有助于维持胆固醇代谢的平衡,防止胆固醇的堆积。为了探究制备的 PA-rHDL 吸收和转运细胞内胆固醇的能力,研究使用不同浓度的 PA-rHDL 处理 RAW264.7 细胞,检测细胞内胆固醇水平变化。实验结果显示,与对照组相比,PA-rHDL

处理后的细胞内总胆固醇 (TC) 水平显著下调,并且呈现浓度依赖性,PA-rHDL 的浓度越高,TC 含量越低 (图 6C)。这一现象说明,发酵表达的 PBP-ApoA1 完整保留了 ApoA1 自身的生物活性,制备的 PA-rHDL 具备仿生性,可作为载体包载药物或其他功能物质,是一种优良的活性纳米药物递送系统。

Cur 具有抗氧化作用,可通过促进一氧化氮合酶产生一氧化氮抑制 LDL 的氧化和脂质修饰,从而减少 oxLDL 的产生,还可抑制巨噬细胞对 oxLDL 的摄取。实验通过油红 O 染色观察细胞内脂滴的含量,由显微镜拍摄的图片 (图 6D) 可以看出,oxLDL 处理 24 h 后的 RAW264.7 细胞内形成了大量红色点状脂滴,而加入 Cur 与 PA-rHDL-Cur 后,细胞内的红色脂滴明显减少,说明 Cur 和 PA-rHDL-Cur 的处理抑制了 RAW264.7 细胞对 oxLDL 的摄取。

4 讨论

利用大肠埃希菌原核表达体系发酵表达融合蛋白可以在不改变天然蛋白活性的前提下赋予其多功能性。此外,以蛋白为基材制备的仿生纳米递送系统,生物相容性高,免疫原性较低。本研究通过基因工程方法将 P-选择素绑定肽 PBP 与载脂蛋白 A1 (ApoA1) 融合,赋予 ApoA1 靶向聚集在 AS 斑块部位的能力。进一步地,通过薄膜水化法制备了具有 AS 靶向性的仿生重组高密度脂蛋白 PA-rHDL,该仿生 rHDL 自身具有优异的增强巨噬细胞胆固醇外排能力,可通过胆固醇逆向转运促进 AS 斑块的消退。此外,它还是一种性能优良的药物递送载体,PA-rHDL 可负载大量疏水性药物,通过其双层膜



A - 激光共聚焦观察不同样品对 RAW264.7 细胞内 ROS 的清除效果 (标尺 = 50 μm); B - 图 A 的定量结果, 与 LPS 组比, ¹⁾ $P < 0.01$, ²⁾ $P < 0.001$; C - 不同浓度 PA-rHDL 处理后 RAW264.7 细胞的 TC 水平, 与 0 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 组比, ³⁾ $P < 0.0001$; D - 显微镜图像显示不同样品处理后 RAW264.7 细胞内被油红 O 染色的脂滴 (标尺 = 10 μm)。

A - the ROS scavenging effect of different samples in RAW264.7 cells observed by CLSM (scale bar = 50 μm); B - the quantitative results of ROS scavenging effect, ¹⁾ $P < 0.01$, ²⁾ $P < 0.001$, vs LPS; C - the total cholesterol level in RAW264.7 cells after different concentrations of PA-rHDL treatment, ³⁾ $P < 0.0001$, vs 0 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ PA-rHDL group; D - the microscope images of RAW264.7 cells treated with different samples and stained with oil red O (scale bar = 10 μm).

图 6 PA-rHDL-Cur 对动脉粥样硬化的治疗效果检测。 $n = 3, \bar{x} \pm s$

Fig. 6 The effect of PA-rHDL-Cur on the treatment of atherosclerosis. $n = 3, \bar{x} \pm s$

结构对药物起到良好的保护作用, 提高药物稳定性。本研究中, PA-rHDL 包载模型药物 Cur 后, 不仅表现出对活化血小板的特异性靶向黏附, 还能递送 Cur 到达靶细胞内部发挥抗氧化和抑制 oxLDL 摄取的作用。本研究的设计策略及实验结果为开发治疗 AS 和其他心血管疾病药物递送体系提供了参考与理论依据。

REFERENCES

[1] GOTTESMAN R F, HAO Q. Atherosclerosis all around; no plaque is innocent [J]. *Lancet Neurol*, 2023, 22(4):286-288.
 [2] KOELWYN G J, CORR E M, ERBAY E, et al. Regulation of macrophage immunometabolism in atherosclerosis [J]. *Nat Immunol*, 2018, 19(6):526-537.

[3] DARABI M, GUILLAS BAUDOIN I, LE GOFF W, et al. Therapeutic applications of reconstituted HDL: When structure meets function [J]. *Pharmacol Ther*, 2016, 157:28-42.
 [4] ROHATGI A, WESTERTERP M, VON ECKARDSTEIN A, et al. HDL in the 21st century: A multifunctional roadmap for future HDL research [J]. *Circulation*, 2021, 143(23):2293-2309.
 [5] BHALE A S, VENKATARAMAN K. Leveraging knowledge of HDLs major protein ApoA1: Structure, function, mutations, and potential therapeutics [J]. *Biomed Pharmacother*, 2022, 154:113634. DOI: 10.1016/j.biopha.2022.113634.
 [6] FOX C A, MOSCHETTI A, RYAN R O. Reconstituted HDL as a therapeutic delivery device [J]. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Biol Lipids*, 2021, 1866(11):159025. DOI:10.1016/j.bbalip.2021.159025
 [7] OUMET M, BARRETT T J, FISHER E A. HDL and reverse cholesterol transport basic mechanisms and their roles in vascular health and disease [J]. *Circ Res*, 2019, 124(10):

- 1505-1518.
- [8] GAO J, LI Z, LI J, *et al.* Peptide-based HDL as an effective delivery system for lipophilic drugs to restrain atherosclerosis development [J]. *Int J Nanomed*, 2022, 17:3877-3892.
- [9] JOMARD A, OSTO E. High density lipoproteins: Metabolism, function, and therapeutic potential [J]. *Front Cardiovasc Med*, 2020, 7:39. DOI:10.3389/fcvm.2020.00039.
- [10] HUANG J, WANG D, HUANG L, *et al.* Roles of reconstituted high-density lipoprotein nanoparticles in cardiovascular disease: A new paradigm for drug discovery [J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(3):739. DOI:10.3390/ijms21030739.
- [11] JEBARI BENSLAIMAN S, URIBE K B, BENITO VICENTE A, *et al.* Boosting cholesterol efflux from foam cells by sequential administration of rHDL to deliver microRNA and to remove cholesterol in a triple-cell 2D atherosclerosis model [J]. *Small*, 2022, 18(13):2105915. DOI: 10.1002/smll.202105915.
- [12] HE J, YANG Y, ZHOU X, *et al.* Shuttle/sink model composed of β -cyclodextrin and simvastatin-loaded discoidal reconstituted high-density lipoprotein for enhanced cholesterol efflux and drug uptake in macrophage/foam cells [J]. *J Mater Chem B*, 2020, 8(7):1496-1506.
- [13] PATEL H, DING B, ERNST K, *et al.* Characterization of apolipoprotein A-I peptide phospholipid interaction and its effect on HDL nanodisc assembly [J]. *Int J Nanomed*, 2019, 14:3069-3086.
- [14] DELK S C, CHATTOPADHYAY A, ESCOLA GIL J C, *et al.* Apolipoprotein mimetics in cancer [J]. *Semin Cancer Biol*, 2021, 73(SI):158-168.
- [15] COCHRAN B J, ONG K L, MANANDHAR B, *et al.* APOA1; A protein with multiple therapeutic functions [J]. *Curr Atheroscler Rep*, 2021, 23(3):11. DOI:10.1007/s11883-021-00906-7.
- [16] YOO J A, LEE E Y, PARK J Y, *et al.* Different functional and structural characteristics between ApoA-I and ApoA-4 in lipid-free and reconstituted HDL state: ApoA-4 showed less anti-atherogenic activity [J]. *Mol Cells*, 2015, 38(6):573-579.
- [17] VEDHACHALAM C, CHETTY P S, NICKEL M, *et al.* Influence of apolipoprotein (Apo) A-I structure on nascent high density lipoprotein (HDL) particle size distribution [J]. *J Biol Chem*, 2010, 285(42):31965-31973.
- [18] BRACE R J, SORRENSEN B, SVIRIDOV D, *et al.* A gel-based method for purification of apolipoprotein A-I from small volumes of plasma [J]. *J Lipid Res*, 2010, 51(11):3370-3376.
- [19] KIM M, SAHU A, HWANG Y, *et al.* Targeted delivery of anti-inflammatory cytokine by nanocarrier reduces atherosclerosis in Apo E -/- mice [J]. *Biomaterials*, 2020, 226: 119550. DOI:10.1016/j.biomaterials.2019.119550.
- [20] KISUCKA J, CHAUHAN A K, ZHAO B Q, *et al.* Elevated levels of soluble P-selectin in mice alter blood-brain barrier function, exacerbate stroke, and promote atherosclerosis [J]. *Blood*, 2009, 113(23):6015-6022.
- [21] BURGER P C, WAGNER D D. Platelet P-selectin facilitates atherosclerotic lesion development [J]. *Blood*, 2003, 101(7):2661-2666.
- [22] PERKINS L A, ANDERSON C J, NOVELLI E M. Targeting P-selectin adhesion molecule in molecular imaging: P-selectin expression as a valuable imaging biomarker of inflammation in cardiovascular disease [J]. *J Nucl Med*, 2019, 60(12):1691-1697.
- [23] MODERY C L, RAVIKUMAR M, WONG T L, *et al.* Heteromultivalent liposomal nanoconstructs for enhanced targeting and shear-stable binding to active platelets for site-selective vascular drug delivery [J]. *Biomaterials*, 2011, 32(35):9504-9514.
- [24] YAN H, MI X, MIDGLEY A C, *et al.* Targeted repair of vascular injury by adipose - derived stem cells modified with P - selectin binding peptide [J]. *Adv Sci*, 2020, 7(11):1903516. DOI:10.1002/advs.201903516.
- [25] ZHANG Y J, ZHU X, CHEN X L, *et al.* Activated platelets-targeting micelles with controlled drug release for effective treatment of primary and metastatic triple negative breast cancer [J]. *Adv Funct Mater*, 2019, 29(13):1806620. DOI:10.1002/adfm.201806620.
- [26] LI C, MIAO X, LI F, *et al.* Curcuminoids; Implication for inflammation and oxidative stress in cardiovascular diseases [J]. *Phytother Res*, 2019, 33(5):1302-1317.
- [27] CHEN F Y, ZHOU J, GUO N, *et al.* Curcumin retunes cholesterol transport homeostasis and inflammation response in MI macrophage to prevent atherosclerosis [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2015, 467(4):872-878.
- [28] GAO Z Y, ZHANG J R, HOU Y C, *et al.* Boosting the synergism between cancer ferroptosis and immunotherapy via targeted stimuli-responsive liposomes [J]. *Biomaterials*, 2024, 305: 122442. DOI:10.1016/j.biomaterials.2023.122442.

(收稿日期:2023-11-06)