

丝素纳米颗粒药物递送应用的研究进展

龚雪睿¹, 刘丰艺^{2,3,4*}, 杨生^{2,3,4*}

¹重庆医科大学口腔医学院, 重庆

²重庆医科大学附属口腔医院, 重庆

³口腔疾病研究重庆市重点实验室, 重庆

⁴重庆市高等教育口腔生物医学工程重点实验室, 重庆

收稿日期: 2024年3月18日; 录用日期: 2024年5月2日; 发布日期: 2024年5月10日

摘要

丝素蛋白(silk fibroin, SF)是从家蚕(*Bombyx mori*)中提取的天然材料, 已被广泛用作生物医学材料, 具有优越的生物相容性和生物降解性, 提取简便、基团便于修饰等优良性质。由于丝素纳米颗粒对各种药物具有较高的结合能力、可控的药物释放特性和温和的制备条件, 其药物递送方面的研究受到了广泛的关注。本文综述了丝素纳米颗粒的最新进展, 包括丝素蛋白化学结构、性质和纳米颗粒制备及改性方法。此外, 还对丝素纳米颗粒作为治疗药物载体的应用进行了综述, 并对其现存问题和发展前景进行了分析, 为开发更好的SF纳米颗粒提供参考依据。

关键词

丝素, 纳米颗粒, 药物递送, 生物响应, 表面改性

Advances in the Study of Silk Fibroin Nanoparticles for Drug Delivery Applications

Xuerui Gong¹, Fengyi Liu^{2,3,4*}, Sheng Yang^{2,3,4*}

¹School of Stomatology, Chongqing Medical University, Chongqing

²Stomatological Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing

³Chongqing Key Laboratory of Oral Diseases, Chongqing

⁴Chongqing Municipal Key Laboratory of Oral Biomedical Engineering of Higher Education, Chongqing

Received: Mar. 18th, 2024; accepted: May 2nd, 2024; published: May 10th, 2024

*通讯作者。

文章引用: 龚雪睿, 刘丰艺, 杨生. 丝素纳米颗粒药物递送应用的研究进展[J]. 材料科学, 2024, 14(5): 580-589.
DOI: 10.12677/ms.2024.145065

Abstract

Silk fibroin (SF), a natural material extracted from the silkworm (*Bombyx mori*), has been widely used as a biomedical material with excellent properties such as superior biocompatibility and biodegradability, easy extraction, and easy modification of the moiety. Due to the high binding capacity of SF nanoparticles for various drugs, controllable drug release properties and mild preparation conditions, the research on their drug delivery has received extensive attention. In this paper, recent advances in SF nanoparticles are reviewed, including the chemical structure, properties and nanoparticle preparation and modification methods of SF proteins. In addition, the application of SF nanoparticles as therapeutic drug carriers is also reviewed, and their existing problems and development prospects are analyzed to provide a reference basis for the development of better SF nanoparticles.

Keywords

Silk Fibroin, Nanoparticles, Drug Delivery, Bio-Responsiveness, Surface Modification

Copyright © 2024 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 引言

丝素蛋白(SF)的独特特性,如缓慢的生物降解、优异的机械性能、良好的加工性能以及生物相容性,已引起人们对该材料的广泛兴趣,其应用范围从纺织品到生物医学用途[1]。由于其优异的性能,基于 SF 的生物材料已被发现适用于多种应用,包括药物输送[2] [3] [4] (微球、纳米颗粒、涂层等)、管道组织再生[5]、皮肤伤口敷料[6]和骨组织支架[7]。其中,纳米颗粒因其作为有效载体提高药物疗效而备受关注。纳米颗粒可以保护药物不被降解,增强生物稳定性、药物在选定组织中被吸收、生物利用度、保留时间、细胞内渗透,并降低患者费用和毒性风险[8]。尤其是 SF 纳米颗粒的生物可降解性、良好的生物相容性、细胞粘附和增殖的改善、化学修饰的潜力和交联的可能性,使其成为一种很有前景的药物传递系统[9]。本文将重点介绍 SF 基纳米颗粒作为药物载体的研究进展。讨论了 SF 的化学结构和性质、SF 基纳米粒子的制备技术及其作为治疗药物载体的应用。

2. 丝素的结构和性质

2.1. 丝素结构

家蚕丝素主要由甘氨酸(43%)、丙氨酸(30%)和丝氨酸(12%)组成[10],丝素的一级结构分为重链和轻链两个部分。重链可以形成稳定的反平行片状微晶,这种特性使丝素蛋白坚固、坚韧,并能抵抗水、弱酸、弱碱和其他降解因子[11] [12]。而轻链的氨基酸构成比例略不同[3],更亲水,对水的抵抗更低,因而有助于丝素的弹性[13]。

丝素的二级结构有三种不同的结构形式,即构象 1 (Silk I)、构象 2 (Silk II)和构象 3 (Silk III)。构象 1 由 α 螺旋、无规则卷曲和 β 折叠结构混合,表现出相对稳定的水溶性构象,但在热力学上不稳定[14]。相反,构象 2 以反平行的 β 折叠和单斜晶体分子模型为特征,因此显示出很高的热阻和机械阻力,并且不

溶于水。构象 3 存在于丝素水溶液的空气 - 水界面自然形成的薄膜中, 是丝素的一种独特晶型。其具有三重螺旋晶体结构, 构象 3 在构象 2 和 1 之间具有结晶性, 使其亚稳(即比构象 2 更不稳定, 但比构象 1 更稳定)。这种构象是由丝素在空气 - 水界面的两亲性形成的[15]。

2.2. 丝素性质

丝素蛋白是制备纳米颗粒的理想生物材料, 因为它具有以下潜在特性: 1) 水溶性, 2) 生物相容性和生物降解性, 3) 结构可改性, 4) 多生物响应性。

2.2.1. 水溶性

再生形式的丝素具有很高的水溶性, 常温下纯水中的溶解度高达 10% w/v (超过此值, 溶液变得非常粘稠并形成凝胶)。丝素溶解度与其结晶多晶型密切相关, 可通过不同的实验因素进行良好控制。如前所述, 丝素构象 1 无定形形式比构象 2 结晶形式更易溶解。因此, 增加构象 2 含量可以降低丝素的溶解度, 反之亦然。此外, pH 值在丝素溶解性中起作用。丝素等电点为 4.53 (3.6~5.2) [16], 因此, 在正常 pH 值为 7.0 时, 丝素带负电荷。丝素等电点附近的 pH 值会减少其电荷, 从而减少排斥力, 从而降低其溶解度并使分子聚集。浓酸性溶液通过聚合物氨基酸残基的质子化增加丝素的溶解度。丝素的水溶性是制备成纳米颗粒、薄膜、水凝胶等其他形式生物材料的基础, 通过改变丝素由构象 1 (水溶状态)转换到构象 2 或构象 3 的制备条件可以赋予产物不同的机械性能, 使其更加符合不同应用的性能要求。Bayraktar 等人报道了不同丝素蛋白浓度、乙醇浓度和 pH 值对制成的纳米颗粒粒径有较大影响。在 60% 的乙醇浓度下, 当丝素蛋白浓度增加时, 平均粒径从 50 nm 变为 250 nm; 在乙醇浓度相对较高的 80% 下, 当丝素蛋白浓度从 1 mg/mL 增加到 1.5 mg/mL 时, 平均粒径从 250 nm 减小到 100 nm [17]。

2.2.2. 生物相容性和生物降解性

生物相容性被认为是生物医用材料最重要的要求之一。许多临床前研究表明, 蚕丝是一种“经临床批准”的人体用生物材料[18]。作为一种天然蛋白质, 丝素降解为无毒副产物氨基酸, 可被人体正常功能吸收、代谢和排泄[19]。一般来说, 丝素蛋白的降解过程始于亲水段, 包括 11 个亲水无定形区域、重链的 C 端和 N 端以及整个轻链。然后, 更多结晶区域的降解随之而来。该过程以绝大部分的晶域降解结束[20]。丝素的降解速率取决于许多因素, 即酶的类型(即蛋白酶 XIV (protease XIV)、 α -糜蛋白酶 (α -chymotrypsin))、丝素结晶度、生物医学环境、制备方法和实验模型。例如, 构象 2 的结晶指数比构象 1 高, 因此需要更长的降解时间。由于其机械强度损失缓慢、无毒副产品以及可控制的降解速率, 与其他合成或天然聚合物相比, SF 在生物医学应用中具有明显的优势[18]。

2.2.3. 结构可改性

对生物材料的固有结构进行遗传和化学修饰的能力至关重要, 因为它可以提高材料的多功能性, 如产生更多功能, 增强特定的细胞结合和相互作用, 减少副作用等。为此, 丝素蛋白是一个合适的选择者, 因为它的氨基酸残基, 如丝氨酸、苏氨酸和天冬氨酸, 提供包括羟基和羧基在内的官能团, 可以与其他试剂形成共价和非共价键[3]。改性丝素也被证明是安全的[21]。

2.2.4. 多生物响应性

早在 2013 年, Kaplan 等人就曾报道没有任何化学修饰的 SF 表现出明显的 pH 反应能力来启动药物释放[22]。Kaplan 等人使用负载多柔比星(DOX)的丝素纳米颗粒在 pH 值类似于血浆(pH 7.4)、早期内体(pH 6.0)和溶酶体(pH 4.5)的缓冲液中监测 DOX 相关荧光。在 pH 值为 4.5 的条件下孵育的载 DOX 丝素纳米颗粒的药物释放速度明显快于其他试验条件下的药物释放速度(两至三倍) [22]。

Gou 等人考虑到 SF 链中的各种官能团(如氨基、二硫键)以及 β 折叠结构, 推断 SF 链可能还具有对谷胱甘肽(GSH)和活性氧(ROS)的内在响应能力[23]。研究证明 GSH 对 β 折叠无明显影响, H_2O_2 会破坏 β 折叠结构, 提升药物释放速度, 也就是丝素对 ROS 有响应释放[23]。SF 的多生物响应性使其适用于肿瘤、炎症、氧化应激等多种疾病微环境中缓释药物。比如 pH 响应性可以利用肿瘤组织与正常组织生理 pH 的差异, 将化疗药物靶向递送或定位释放于肿瘤靶组织; ROS 响应性则可以让药物在炎症或氧化应激环境下在 ROS 水平升高的部位释放出来, 实现靶向精准治疗病灶。

3. 丝素纳米颗粒制备及改性方法

3.1. 丝素溶液的获取

基于丝素蛋白的材料可以使用多种技术生成, 主流的提取方法如下: 首先, 生丝都必须进行脱胶以去除丝胶。生丝在碳酸钠(Na_2CO_3)稀释溶液中煮沸, 再用纯水冲洗和洗涤, 并干燥过夜, 以获得丝素长丝。然后使用适当的溶剂系统, 例如溴化锂水溶液或 Ajisawa 试剂(氯化钙: 乙醇: 水的摩尔比为 1:8:2)来溶解丝素。最后, 通常通过纯水透析去除电解质, 获得丝素水溶液。根据其浓度, 透析后获得的丝素溶液可在 4 度储存数月[24] [25]。

3.2. 丝素纳米颗粒的制备

制备 SF 纳米颗粒的方法有脱溶、盐析、机械粉碎、电喷雾、超临界流体技术等[2], 每种方法各有优缺点, 具体如表 1。脱溶法是获得基于蛋白质的纳米颗粒的最常用方法, 也被称为简单凝聚, 它基于在有机溶剂(如丙酮、乙醇、二甲基亚砜(DMSO)和甲醇)存在下丝素蛋白溶解度的降低, 从而导致相分离。有机溶剂使丝素蛋白脱水和自组装, 导致丝素从构象 1 变化为构象 2, 并形成纳米颗粒。此方法得到的纳米颗粒粒径均一, 杂质较少, 适合用于载药系统[25]。丝素浓度在控制最终纳米系统尺寸和稳定性方面起着至关重要的作用, 但是由于负电荷的静电排斥作用, 无论浓度多少, 纳米颗粒都不会聚集[26]。

Table 1. Common preparation methods and advantages and disadvantages of SF nanoparticles

表 1. SF 纳米颗粒常见制备方法及其优缺点

制备方法	优点	缺点
脱溶	反应条件温和、步骤简单、粒径小	有机溶剂残留
盐析	低成本、操作简单安全、避免使用有毒溶剂	盐剂残留、粒径大
机械粉碎	便于大规模生产	粒径不均匀、需去除杂质和助磨剂
电喷雾	颗粒高纯度、分散性优异	设备要求、步骤较多
超临界流体	无有机溶剂残留、粒径可控	成本高、设备要求高、操作复杂

将药物导入 SF 纳米颗粒的最常见和最直接的方法是在处理前将其直接溶解或混合在 SF 溶液中。此方法适用于稳定性较高的药物, 且要注意制备颗粒时不能对药物的完整性和生物效力产生负面影响。或者, 也可以在 SF 制成纳米颗粒后, 通过吸附或共价偶联将药物并入 SF 纳米颗粒中。这种方法使药物不会暴露在有害的有机溶剂中, 保护了药物的稳定性[27]。然而, 药物与 SF 基质结合或形成结合物的能力取决于其物理化学和化学性质, 可能会受到很大限制。不论何种加入方式, 药物一般与 SF 都存在静电相互作用、氢键作用或疏水作用, 这可能会破坏 SF 反平行 β -折叠结构的氢键作用, 使结晶度下降, 影响药物的包封率和释放速率[28]。此外, 药物的溶解度和 pKa 值也会影响 SF 的包封率和载药量[28]。

3.3. 丝素纳米颗粒的表面改性

如前所述, 丝素的氨基酸残基可与其他分子形成共价键或非共价键, 如氨基、羧基和巯基, 这些基团可用于化学修饰, 从而赋予丝素纳米颗粒一些高级功能(例如电荷反转、药物控制释放和靶向性) [27] [29] [30], 总结如表 2。

Table 2. Common modification methods and characteristics of SF nanoparticles

表 2. SF 纳米颗粒常见改性方法及其特点

改性方法	酰胺反应	EDC/PEI	转基因技术
作用	获得接枝部分的靶向性或响应性	修改表面电荷	直接改变丝素蛋白结构
适用于	接枝带氨基或羧基结构的官能团结构	药物带负电荷导致包封效率低下	需要插入或修改丝素蛋白基因片段
缺点	SFNP 表面的氨基酸残基不多, 可能接枝效率偏低	PEI 存在细胞毒性	基因编辑过程较复杂

例如, 为了提高肿瘤靶向性, Sun 等人制备了负载多柔比星(DOX)的 SFNPs, 并通过丝素蛋白的氨基和叶酸(FA)分子的羧基之间的化学反应, 用 FA 进一步使其表面功能化。获得的 FA-DOX NP 可被 FA 受体过度表达的肿瘤细胞特异性内化, 并以受控方式释放负载的 DOX。他们进一步发现, FA 的表面功能化显著改善了化疗效果, 并减少了 DOX 的潜在副作用[31]。

此外, Pham 等人利用反应性碳二亚胺(EDC)或聚乙烯亚胺(PEI)制备了一种新型 SFNPs。研究发现, 所有开发的交联核动力源的流体动力粒径与传统的 SFNPs 相似, 其 zeta 电位被控制从负电荷变为正电荷。此外, 这些 SFNPs 的结晶度随着 EDC 量的增加或 PEI 含量的降低而增加, 这种变化可以提高药物包封效率[32]。但是他们团队也发现高浓度(1 和 0.5 mg/mL)的 PEI-SFNP 显示出细胞活力显著降低[33]。

转基因技术是通过在家蚕基因组中插入或替换基因以生成新型丝素衍生物来生产改性丝素蛋白的另一种有希望的策略[34] [35]。近年来, 这一策略引起了越来越多的关注, 因为它可以从根本上改变丝素蛋白的一级结构。Xia 等人利用基因工程技术调整了丝素蛋白中弹性蛋白的比例, 获得了可通过自组装形成纳米颗粒的丝弹性蛋白样蛋白(SELP)。第一步是自发形成的以丝块为核心结构的胶束, 这是由丝块之间的氢键驱动的; 第二步由弹性蛋白块之间的疏水相互作用驱动, 导致 SELP 分子有序缔合。在组装过程中, 药物可以封装在 SELP 基质中形成纳米颗粒[36]。Ma 等人使用了由另一种蚕提取出的丝素蛋白: 柞蚕, 柞蚕丝素蛋白含有丰富的精氨酸-甘氨酸-天冬氨酸(RGD)三肽, 这是家蚕丝素蛋白所没有的[37]。这些三肽可以特异性结合整合素受体, 整合素受体在炎症结肠的结肠上皮细胞(CEC)和巨噬细胞的质膜上大量表达, 这种结合特异性使基于柞蚕丝素蛋白的纳米颗粒能够靶向 CEC 和结肠巨噬细胞[38] [39]。

4. 丝素纳米颗粒在药物递送系统的应用

丝素纳米颗粒(SFNPs)在提供各种治疗性化合物方面具有极其广泛的用途, 从小分子到大分子, 从疏水性到亲水性物质, 从稳定药物到不稳定药物, 如蛋白质、酶、疫苗和 DNA。此外, 丝素分子结构由多种氨基酸组成, 这些氨基酸具有官能团(即胺、羟基、羧基、硫醇), 可以附着不同的生物分子或抗体作为主动靶向的标记。通过上部分所述的表面改性方法, 这些官能团可以通过例如用聚合物接枝来改变控制纳米颗粒的去向[28]。

4.1. 小分子药物

对于以 SF 为基础的纳米颗粒的小型药物输送, 大部分研究集中在抗癌药物[40] [41]和抗炎药物[42]

输送上。目前大多数抗癌药物都存在不良的生物分布、全身毒性和不良副作用[8]。为了有效治疗肿瘤,抗癌药物应该通过体内屏障进入所需靶向的肿瘤组织,并且在血液循环中的药物损失最小。一旦到达肿瘤组织区域,抗癌药物可以通过被动和主动靶向选择性杀死靶向肿瘤细胞,而不会损害正常细胞[40] [43]。此外,药物应以受控的方式释放,以达到预期的治疗效果。

Chen 等人开发了负载吡啶菁绿的 SFNPs [44]。这些粒子表现出很高的光热稳定性和 pH 响应性,其中染料在肿瘤酸性环境中特异性释放。在体外和体内实验中,这些颗粒可以通过光诱导热疗破坏肿瘤细胞[44]。Pham 等人首次通过交联反应制备了含有 α -芒果蛋白(alpha-mangostin)的交联 SFNPs, α -芒果蛋白是从芒果果皮中提取的一种潜在化疗剂用于抗癌[28]。使用 EDC 或 PEI 作为交联剂,这些颗粒呈球形,平均尺寸约为 300 nm。粒子表面电荷可以通过改变交联剂的类型和/或数量,达到 15 至 30 mV。交联 SFNPs 的包封率(70%)和载药量(7%)均高于非交联 SFNPs。此外,这些颗粒将 α -芒果蛋白的溶解度增加了三倍,具有超过 72 小时的缓释性,并将药物的血液毒性降低了 90%。在 Caco-2 大肠和 MCF-7 乳腺癌细胞系上,验证了交联 SFNPs 有药物治疗效果,同时显示出比游离 α -芒果蛋白更大的细胞毒性[28]。类似地,Ding 等人用雷公藤中分离的两种主要中药成分雷公藤甲素和雷公藤红素制备了 SFNPs,用于胰腺癌治疗[45]。这些 170 nm 的负电荷粒子有大于 80% 的高包封率,在溶酶体 pH 为 4.5 时快速释放药物,在血浆 pH 为 7.4 时延迟释放药物。与游离药物相比,载药 SFNPs 对 MIA-PaCa-2 和 PANC-1 胰腺癌细胞系的作用强 2~3 倍(即 IC50 更低)。此外,与单独使用每种配方相比,负载雷公藤甲素和南蛇藤醇的 SFNPs 联合治疗可协同抑制癌细胞生长[45]。

Gou 等人利用口服和静脉给药,开发了含有姜黄素的 SFNPs,用硫酸软骨素为其功能化,作为治疗溃疡性结肠炎的多生物反应平台[23]。这些球形粒子的平均粒径约为 175.4 nm,粒径分布窄,表面 zeta 电位约为 -35.5 mV。硫酸软骨素包裹的颗粒表面产生了显著的靶向性给药,从而增强了姜黄素的抗炎活性。在巨噬细胞内吞后,这些 SFNPs 可被 pH 值和活性氧等内在刺激触发,在细胞内释放药物。此外,在小鼠体内进行的动物实验表明,这些 SFNPs 通过口服和静脉给药途径,可以有效减少溃疡性结肠炎症状,同时保持肠道微生物群的完整性,提高小鼠存活率[23]。Xu 等人用类似的方法将姜黄素包进 SFNPs,通过螯合线粒体中的铁离子,减轻氧化应激损伤,治疗小鼠的共济失调[46]。

Chomchalao 等人成功开发了负载两性霉素 B 的 FNPs,并与聚合物 PEG 400 结合,作为真菌性角膜炎治疗的成品滴眼液[47]。用去溶剂法制备的颗粒呈均匀球形,平均粒径约为 270 nm,zeta 电位约为 -17 mV,包封率约为 65%。两性霉素 B 以无定形分子分散体和单体形式紧紧包埋在 SFNPs 中,在体外无刺激条件下 6 小时没有检测到药物释放。同时,载药 SFNPs 保留了对白色念珠菌的抗真菌活性,与市面上销售的两性霉素 B 脱氧胆酸盐相比,对人角膜上皮细胞系的细胞毒性更小[47]。

Ma 等人经过筛选和工程设计,使用柞蚕丝素(ApSF)制作出含有抗炎药物白藜芦醇(Res)的 SFNPs。Res-SFNPs 的内在特征包括靶向结肠上皮细胞和巨噬细胞、溶酶体逃逸能力以及对 pH、活性氧(ROS)和谷胱甘肽的反应性,支持靶细胞细胞质中 Res 分子的按需释放。Res-SFNPs 治疗恢复受损的结肠上皮屏障,使巨噬细胞极化为 M2 型,减轻炎症反应,降低细胞内 ROS 水平。口服含有 Res-SFNPs 的壳聚糖-海藻酸钠水凝胶可显著缓解结肠炎症状,表现为结肠炎症减轻,紧密连接蛋白合成增加,肠道微生物群重新平衡[37]。

小分子药物由于易于被身体吸收,常出现在未到达病灶就被吸收代谢的尴尬局面,通过丝素纳米颗粒的包裹,可以保护药物到达疾病部位再通过生物响应性释放药物,以此达到减弱不良的生物分布、全身毒性和不良副作用的效果。然而由于大多数小分子药物被 SFNPs 包封时,通常没有高效的化学键合,仅仅是物理结合或吸附在表面,导致载药量低下,即使在最高的安全剂量的情况下,也存在无法将足够的化学药物输送到期望的指定区域的风险。目前 SFNPs 递送小分子药物方面的研究所报道的载药率多难

超过 15%，在今后的研究可以对 SFNPs 载药率方面进行提升改进。

4.2. 蛋白多肽类药物

在大多数情况下，用于生物医学应用的治疗性蛋白质是生长因子和酶。生长因子是能够刺激细胞生长和分化的多肽，在组织再生领域是有益的。酶是一组负责加速化学反应的生物催化作用的蛋白质，因此，缺乏酶可能会导致严重的疾病。这些蛋白质临床应用往往存在半衰期短、稳定性低、组织渗透性有限和潜在毒性等缺点。为此，SFNPs 被用于输送这些大分子以增加蛋白质输送有效性。

Yang 等人使用去溶剂化方法制备 SFNPs，将标记有 FITC 的牛血清白蛋白封装在玻璃体内注射到视网膜[48]。SFNPs 的粒径分布较窄，平均粒径为 179.1 ± 3.7 nm，zeta 电位约为 -25 mV，对人视网膜色素上皮 AREP-19 细胞无明显体外细胞毒性。与游离药物相比，新西兰白兔玻璃体内注射 SFNPs 后，SFNPs 局部分布，并延长了在视网膜中的滞留时间[48]。

对于生长因子输送，利用 SFNPs 作为骨形态发生蛋白-2 (BMP-2)的载体，骨形态发生蛋白-2 是一种属于转化生长因子 β (TGF β)超家族的骨生长调节因子，有助于促进骨组织再生。Shi 等人通过去溶剂化制备了平均尺寸约为 250 nm 的载骨形态发生蛋白-2 (BMP-2) SF 纳米颗粒。BMP-2 的加载效率约为 89.3%。这些纳米颗粒显示出 BMP-2 的受控释放，并显著增强了间充质干细胞(MSCs)的成骨分化，这在高碱性磷酸酶(ALP)酶活性以及成骨基因表达水平的增加中很明显[49]。

Kim 等人开发了封装在阳离子脂质中的 SFNPs，将 Pin1 异构酶(一种肽基脯氨酸顺反异构酶，可与几种蛋白质的磷酸丝氨酸脯氨酸或磷酸苏氨酸脯氨酸基序结合)直接输送到细胞质中[50]。这些 SFNPs 脂质复合物以高效率和低细胞毒性成功地传递酶，从而导致 Runx2 和 Smad 信号的增加，随后恢复成骨标记基因的表达和 Pin1 缺陷细胞中矿物质的沉积[50]。

蛋白质多肽类药物较短的半衰期以及稳定性是限制其临床应用的主要影响因素，而 SFNPs 较长的生物降解时间可以解决这一问题。大部分的研究通过 SFNPs 和蛋白多肽类药物的共组装，成功实现了药物的定向分布和延长滞留时间，避免了频繁多次给药。然而目前的实验大多局限在体外，需要更多的体内实验数据验证药物的缓释效果。

4.3. 基因类药物

Song 等人利用盐析法在添加和不添加磁性 NPs 的情况下制备了 SF-PEI-NPs，用于将 c-myc 反义寡核苷酸(antisense oligodeoxynucleotides)靶向输送至 MDA-MB-231 乳腺癌细胞系[51]。通过改变丝素的含量，可以控制粒径和 zeta 电位。与仅 PEI-NP 相比，SF-PEI-NP (含和不含磁性 NPs)的细胞毒性较小，可以成功地将包裹的遗传物质输送到 MDA-MB-231 细胞中。通过利用磁感染，与通过非磁感染的相同载体相比，丝素 PEI 与磁性 NPs 的结合在 20 分钟内显著增强了细胞的摄取(超过 70%) [51]。

Shahbazi 等人将低聚壳聚糖-SFNPs 作为 siRNA 治疗的输送系统，与低聚壳聚糖-siRNA 复合物(无丝素)相比较[52]。与多聚体(250~450 nm)相比，颗粒大小没有显著差异，但丝素含量的增加可以增加 siRNA 的负载能力。此外，这些颗粒在含有胎牛血清和肝素的情况下比不含丝素的多肽更稳定。MTT 分析表明，这些 NPs 具有较低的细胞毒性，并且显示出更好的 siRNA 基因沉默效果，这可能是由于负载效率、血清稳定性和细胞摄取增强所致[52]。

SFNPs 可以达到保护基因类药物在进入细胞前不变性降解、被细胞识别并进入细胞的作用。可是上述两篇文章分别通过添加磁性或引入其他成分的方式来提高 SFNPs 的细胞摄取率，说明单纯的 SFNPs 存在细胞摄取率较低的缺点，这一点不如常见的基因递送系统病毒载体或脂质纳米颗粒，以后的研究希望可以推出更简单便捷地提高 SFNPs 细胞摄取率的方法。

5. 总结与展望

丝素蛋白纳米颗粒(SFNPs)具有良好的水溶性、生物相容性、可降解性、结构可改性和多生物响应性,是一种很有前景的药物载体,已被广泛用于递送小分子药物、蛋白质药物和基因药物等。实验人员可以根据自身设备条件和需求选择不同的制备方式,得到理想性能的 SFNPs。包裹在 SFNPs 中的药物,储存的稳定性得到提高;因为 SF 还具有多个活性氨基酸残基,可以很容易地进行修饰以添加新功能,通过靶向改性和生物响应,药物的吸收和生物利用度也能够得到提高。尽管 SFNPs 的优异性能使其成为一种有前途的药物载体,但仍有必要解决一些关键问题。例如,每种纳米颗粒制备方法都有其优缺点,继续开发更好的纳米颗粒制备技术以满足不同的需求非常重要。在递送不同类型药物的应用中,还出现了载药量低下、缺乏体内研究数据和细胞摄取率低下等问题。此外,由于 SFNPs 和其负载的药物代谢速率存在差异,在长时间应用的后期,堆积的丝素碎片有可能对细胞产生毒性,对如何提高 SF 生物降解方面的研究尚缺。丝素蛋白纳米颗粒具有广阔的应用前景,如果可以对上述缺点加以改善,有望在药物递送方面开发出更多更好的产品,解决实际临床问题。

参考文献

- [1] Altman, G.H., Jakuba, C., Calabro, T., Horan, R.L., Chen, J.S., Lu, H., Richmond, J. and Kaplan, D.L. (2003) Silk-Based Biomaterials. *Biomaterials*, **24**, 401-416. [https://doi.org/10.1016/S0142-9612\(02\)00353-8](https://doi.org/10.1016/S0142-9612(02)00353-8)
- [2] Zhao, Z., Li, Y. and Xie, M.B. (2015) Silk Fibroin-Based Nanoparticles for Drug Delivery. *International Journal of Molecular Sciences*, **16**, 4880-4903. <https://doi.org/10.3390/ijms16034880>
- [3] Crivelli, B., Perteghella, S., Bari, E., et al. (2018) Silk Nanoparticles: From Inert Supports to Bioactive Natural Carriers for Drug Delivery. *Soft Matter*, **14**, 546-557. <https://doi.org/10.1039/C7SM01631J>
- [4] Nguyen, T.P., Nguyen, Q.V., Nguyen, V.H., et al. (2019) Silk Fibroin-Based Biomaterials. Biomedical Applications: A Review. *Polymers*, **11**, Article 1933. <https://doi.org/10.3390/polym11121933>
- [5] Lv, X., Feng, C., Liu, Y., et al. (2018) A Smart Bilayered Scaffold Supporting Keratinocytes and Muscle Cells in Micro/Nano-Scale. Urethral Reconstruction. *Theranostics*, **8**, 3153-3163. <https://doi.org/10.7150/thno.22080>
- [6] Roh, D.H., Kang, S.Y., Kim, J.Y., et al. (2006) Wound Healing Effect of Silk Fibroin/Alginate-Blended Sponge in Full Thickness Skin Defect of Rat. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, **17**, 547-552. <https://doi.org/10.1007/s10856-006-8938-y>
- [7] Hoque, J., Shih, Y.V., Zeng, Y., et al. (2021) Bone Targeting Nanocarrier-Assisted Delivery of Adenosine to Combat Osteoporotic Bone Loss. *Biomaterials*, **273**, Article ID: 120819. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2021.120819>
- [8] Egusquiaguirre, S.P., Igartua, M., Hernandez, R.M. and Pedraz, J.L. (2012) Nanoparticle Delivery Systems for Cancer Therapy: Advances in Clinical and Preclinical Research. *Clinical and Translational Oncology*, **14**, 83-93. <https://doi.org/10.1007/s12094-012-0766-6>
- [9] Huang, W., Ling, S., Li, C., et al. (2018) Silkworm Silk-Based Materials and Devices Generated Using Bio-Nanotechnology. *Chemical Society Reviews*, **47**, 6486-6504. <https://doi.org/10.1039/C8CS00187A>
- [10] Ma, Y., Canup, B.S.B., Tong, X., et al. (2020) Multi-Responsive Silk Fibroin-Based Nanoparticles for Drug Delivery. *Frontiers in Chemistry*, **8**, Article 585077. <https://doi.org/10.3389/fchem.2020.585077>
- [11] Keten, S., Xu, Z., Ihle, B. and Buehler, M.J. (2010) Nanoconfinement Controls Stiffness, Strength and Mechanical Toughness of β -Sheet Crystals in Silk. *Nature Materials*, **9**, 359-367. <https://doi.org/10.1038/nmat2704>
- [12] Numata, K., et al. (2017) Silk Resin With Hydrated Dual Chemical-Physical Cross-Links Achieves High Strength and Toughness. *Biomacromolecules*, **18**, 1937-1946. <https://doi.org/10.1021/acs.biomac.7b00376>
- [13] Wadbua, P., Promdonkoy, B., Maensiri, S. and Siri, S. (2010) Different Properties of Electrospun Fibrous Scaffolds of Separated Heavy-Chain and Light-Chain Fibroins of *Bombyx mori*. *International Journal of Biological Macromolecules*, **46**, 493-501. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2010.03.007>
- [14] Qi, Y., Wang, H., Wei, K., et al. (2017) A Review of Structure Construction of Silk Fibroin Biomaterials from Single Structures to Multi-Level Structures. *International Journal of Molecular Sciences*, **18**, Article 237. <https://doi.org/10.3390/ijms18030237>
- [15] Valluzzi, R., Gido, S.P., Muller, W. and Kaplan, D.L. (1999) Orientation of Silk III at the Air-Water Interface. *International Journal of Biological Macromolecules*, **24**, 237-242. [https://doi.org/10.1016/S0141-8130\(99\)00002-1](https://doi.org/10.1016/S0141-8130(99)00002-1)

- [16] Foo, C.W. P., Bini, E., Hensman, J., *et al.* (2005) Role of PH and Charge on Silk Protein Assembly in Insects and Spiders. *Applied Physics A*, **82**, 223-233. <https://doi.org/10.1007/s00339-005-3426-7>
- [17] Bayraktar, O., Oder, G., Erdem, C., *et al.* (2023) Selective Encapsulation of the Polyphenols on Silk Fibroin Nanoparticles: Optimization Approaches. *International Journal of Molecular Sciences*, **24**, Article 9327. <https://doi.org/10.3390/ijms24119327>
- [18] Cao, Y. and Wang, B. (2009) Biodegradation of Silk Biomaterials. *International Journal of Molecular Sciences*, **10**, 1514-1524. <https://doi.org/10.3390/ijms10041514>
- [19] Numata, K., Cebe, P. and Kaplan, D.L. (2010) Mechanism of Enzymatic Degradation of Beta-Sheet Crystals. *Biomaterials*, **31**, 2926-2933. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2009.12.026>
- [20] Holland, C., Numata, K., Rnjak-Kovacina, J. and Seib, F.P. (2019) The Biomedical Use of Silk: Past, Present, Future. *Advanced Healthcare Materials*, **8**, e1800465. <https://doi.org/10.1002/adhm.201800465>
- [21] Teramoto, H. and Kojima, K. (2015) Incorporation of Methionine Analogues into *Bombyx mori* Silk Fibroin for Click Modifications. *Macromolecular Bioscience*, **15**, 719-727. <https://doi.org/10.1002/mabi.201400482>
- [22] Seib, F.P., Jones, G.T., Rnjak-Kovacina, J., *et al.* (2013) PH-Dependent Anticancer Drug Release from Silk Nanoparticles. *Advanced Healthcare Materials*, **2**, 1606-1611. <https://doi.org/10.1002/adhm.201300034>
- [23] Gou, S., Huang, Y., Wan, Y., *et al.* (2019) Multi-Bioresponsive Silk Fibroin-Based Nanoparticles with On-Demand Cytoplasmic Drug Release Capacity for CD44-Targeted Alleviation of Ulcerative Colitis. *Biomaterials*, **212**, 39-54. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2019.05.012>
- [24] Zhang, Y.Q. (2018) Preparation of Silk Fibroin Nanoparticles and Enzyme-Entrapped Silk Fibroin Nanoparticles. *Bio Protocol*, **8**, e3113. <https://doi.org/10.21769/BioProtoc.3113>
- [25] Wongpinyochit, T., Johnston, B.F. and Seib, F.P. (2016) Manufacture and Drug Delivery Applications of Silk Nanoparticles. *Journal of Visualized Experiments*, **116**, Article 54669. <https://doi.org/10.3791/54669-v>
- [26] Zhang, Y.Q., Shen, W.D., Xiang, R.L., *et al.* (2006) Formation of Silk Fibroin Nanoparticles in Water-Miscible Organic Solvent and Their Characterization. *Journal of Nanoparticle Research*, **9**, 885-900. <https://doi.org/10.1007/s11051-006-9162-x>
- [27] Wenk, E., Merkle, H.P. and Meinel, L. (2011) Silk Fibroin as a Vehicle. Drug Delivery Applications. *Journal of Controlled Release*, **150**, 128-141. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2010.11.007>
- [28] Pham, D.T., Saelim, N. and Tiyaboonchai, W. (2019) Crosslinked Silk Fibroin-Based Nanoparticles for Cancer Chemotherapy. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, **181**, 705-713. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2019.06.011>
- [29] Chen, J., Venkatesan, H. and Hu, J. (2018) Chemically Modified Silk Proteins. *Advanced Engineering Materials*, **20**, Article ID: 1700961. <https://doi.org/10.1002/adem.201700961>
- [30] Pandey, V., Haider, T., Jain, P., *et al.* (2020) Silk as a Leading-Edge Biological Macromolecule for Improved Drug Delivery. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, **55**, Article ID: 101294. <https://doi.org/10.1016/j.jddst.2019.101294>
- [31] Sun, N., Lei, R., Xu, J., *et al.* (2018) Fabricated Porous Silk Fibroin Particles. PH-Responsive Drug Delivery and Targeting of Tumor Cells. *Journal of Materials Science*, **54**, 3319-3330. <https://doi.org/10.1007/s10853-018-3022-9>
- [32] Pham, D.T., Saelim, N. and Tiyaboonchai, W. (2018) Crosslinked Fibroin Nanoparticles Using EDC or PEI for Drug Delivery: Physicochemical Properties, Crystallinity and Structure. *Journal of Materials Science*, **53**, 14087-14103. <https://doi.org/10.1007/s10853-018-2635-3>
- [33] Pham, D.T., Saelim, N., Cornu, R., *et al.* (2020) Crosslinked Fibroin Nanoparticles: Investigations on Biostability, Cytotoxicity, and Cellular Internalization. *Pharmaceuticals*, **13**, Article 86. <https://doi.org/10.3390/ph13050086>
- [34] Shi, P., Gustafson, J.A. and MacKay, J.A. (2014) Genetically Engineered Nanocarriers for Drug Delivery. *International Journal of Nanomedicine*, **9**, 1617-1626. <https://doi.org/10.2147/IJN.S53886>
- [35] Helfricht, N., Doblhofer, E., Duval, J.F.L., Scheibel, T. and Papastavrou, G. (2016) Colloidal Properties of Recombinant Spider Silk Protein Particles. *The Journal of Physical Chemistry C*, **120**, 18015-18027. <https://doi.org/10.1021/acs.jpcc.6b03957>
- [36] Xia, X.X., Xu, Q., Hu, X., *et al.* (2011) Tunable Self-Assembly of Genetically Engineered Silk—Elastin-Like Protein Polymers. *Biomacromolecules*, **12**, 3844-3850. <https://doi.org/10.1021/bm201165h>
- [37] Ma, Y., Duan, L., Sun, J., *et al.* (2022) Oral Nanotherapeutics Based on *Antheraea Pernyi silk* Fibroin for Synergistic Treatment of Ulcerative Colitis. *Biomaterials*, **282**, Article ID: 121410. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2022.121410>
- [38] Rodriguez-Nogales, A., Algieri, F., De Matteis, L., *et al.* (2016) Intestinal Anti-Inflammatory Effects of RGD-Functionalized Silk Fibroin Nanoparticles in Trinitrobenzenesulfonic Acid-Induced Experimental Colitis in Rats.

- International Journal of Nanomedicine*, **11**, 5945-5958. <https://doi.org/10.2147/IJN.S116479>
- [39] Kuwada, T., Shiokawa, M., Kodama, Y., *et al.* (2021) Identification of an Anti-Integrin $\alpha v\beta 6$ Autoantibody in Patients with Ulcerative Colitis. *Gastroenterology*, **160**, 2383-2394.E21. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2021.02.019>
- [40] Florczak, A., Deptuch, T., Kucharczyk, K. And Dams-Kozłowska, H. (2021) Systemic and Local Silk-Based Drug Delivery Systems for Cancer Therapy. *Cancers*, **13**, Article 5389. <https://doi.org/10.3390/cancers13215389>
- [41] Hong, S., Choi, D.W., Kim, H.N., *et al.* (2020) Protein-Based Nanoparticles as Drug Delivery Systems. *Pharmaceutics*, **12**, Article 604. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics12070604>
- [42] Gholipourmalekabadi, M., Sapru, S., Samadikuchaksaraei, A., *et al.* (2020) Silk Fibroin for Skin Injury Repair: Where Do Things Stand? *Advanced Drug Delivery Reviews*, **153**, 28-53. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2019.09.003>
- [43] Alexis, F., Pridgen, E.M., Langer, R., *et al.* (2010) Nanoparticle Technologies for Cancer Therapy. In: Schäfer-Korting, M., Ed., *Drug Delivery*, Springer, Berlin, 55-86. https://doi.org/10.1007/978-3-642-00477-3_2
- [44] Chen, B.Q., Kankala, R.K., He, G.Y., *et al.* (2018) Supercritical Fluid-Assisted Fabrication of Indocyanine Green-Encapsulated Silk Fibroin Nanoparticles for Dual-Triggered Cancer Therapy. *ACS Biomaterials Science & Engineering*, **4**, 3487-3497. <https://doi.org/10.1021/acsbomaterials.8b00705>
- [45] Ding, B., Wahid, M.A., Wang, Z., *et al.* (2017) Triptolide and Celastrol Loaded Silk Fibroin Nanoparticles Show Synergistic Effect against Human Pancreatic Cancer Cells. *Nanoscale*, **9**, 11739-11753. <https://doi.org/10.1039/C7NR03016A>
- [46] Xu, L., Sun, Z., Xing, Z., *et al.* (2022) Cur@SF NPs Alleviate Friedreich's Ataxia in a Mouse Model through Synergistic Iron Chelation and Antioxidation. *Journal of Nanobiotechnology*, **20**, Article No. 118. <https://doi.org/10.1186/s12951-022-01333-9>
- [47] Chomchalao, P., Nimtrakul, P., Pham, D.T., *et al.* (2020) Development of Amphotericin B-Loaded Fibroin Nanoparticles: A Novel Approach for Topical Ocular Application. *Journal of Materials Science*, **55**, 5268-5279. <https://doi.org/10.1007/s10853-020-04350-x>
- [48] Yang, P., Dong, Y., Huang, D., *et al.* (2019) Silk Fibroin Nanoparticles for Enhanced Bio-Macromolecule Delivery to the Retina. *Pharmaceutical Development and Technology*, **24**, 575-583. <https://doi.org/10.1080/10837450.2018.1545236>
- [49] Shi, P., Abbah, S.A., Saran, K., *et al.* (2013) Silk Fibroin-Based Complex Particles with Bioactive Encrustation for Bone Morphogenetic Protein 2 Delivery. *Biomacromolecules*, **14**, 4465-4474. <https://doi.org/10.1021/bm401381s>
- [50] Kim, W.J., Islam, R., Kim, B.S., *et al.* (2017) Direct Delivery of Recombinant Pin1 Protein Rescued Osteoblast Differentiation of Pin1-Deficient Cells. *Journal of Cellular Physiology*, **232**, 2798-2805. <https://doi.org/10.1002/jcp.25673>
- [51] Song, W., Gregory, D.A., Al-Janabi, H., *et al.* (2019) Magnetic-Silk/Polyethyleneimine Core-Shell Nanoparticles for Targeted Gene Delivery into Human Breast Cancer Cells. *International Journal of Pharmaceutics*, **555**, 322-336. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2018.11.030>
- [52] Shahbazi, B., Taghipour, M., Rahmani, H., Sadrjavadi, K. and Fattahi, A. (2015) Preparation and Characterization of Silk Fibroin/Oligochitosan Nanoparticles for siRNA Delivery. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, **136**, 867-877. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2015.10.044>