

·综述·

生物来源蛋白纳米递药系统研究进展：以白蛋白、 丝素蛋白和玉米醇溶蛋白为例

陈庆鑫[†] 刘靖杨[†] 王亚松 罗沛力 黄郑炜^{*}

(暨南大学药学院, 广州 511443)

摘要: 传统给药剂型的药物生物利用度低, 且难以实现缓释、定向给药, 因此迫切需要开发新的剂型以满足临床需求。纳米递药系统具有可实现靶向给药的特点, 引起了人们的广泛关注。其中蛋白质纳米递药系统可显著改善药物的水溶性和稳定性, 降低药物的使用剂量以减轻副作用, 生物相容性高并且在体内可降解, 是一种具有潜在开发价值的生物有机材料。其中, 白蛋白纳米粒、丝素蛋白纳米粒、玉米醇溶蛋白纳米粒3种不同生物来源的蛋白纳米粒是极具代表性的蛋白质纳米递药系统。本综述介绍了上述3种蛋白纳米粒的特点、制备方法和应用现状, 并讨论了当前研究中存在的难题和可能的解决方案, 为进一步开展基于蛋白质纳米粒的新药研发工作提供一定的参考。

关键词: 蛋白质纳米粒; 白蛋白; 丝素蛋白; 玉米醇溶蛋白; 递药系统

Research Progress on Biogenic Protein Nano-drug Delivery Systems: Taking Albumin, Silk Fibroin and Zein as Examples

CHEN Qing-xin[†], LIU Jing-yang[†], WANG Ya-song, LUO Pei-li, HUANG Zheng-wei^{*}

(College of Pharmacy, Jinan University, Guangzhou 511443, China)

Abstract: Drugs in traditional dosage forms have low bioavailability and it is difficult to achieve sustained release and targeted administration. Therefore, it is imperative to develop new dosage forms that meet the clinical needs of patients. Nanocarrier drug delivery systems have the characteristics of achieving targeted drug delivery, which has attracted considerable interest within the scientific community. Among them, the protein nanoparticle delivery system can significantly enhance the water solubility and stability of the drug, reduce the dosage of the drug to alleviate side effects, and be biodegradable in the body with minimal irritation. Among these, albumin nanoparticles, silk fibroin nanoparticles, and zein nanoparticles, three protein nanoparticles derived from different biological sources, are highly representative protein nanoparticle drug delivery systems. This review introduced the characteristics, preparation methods and application status of the aforementioned three protein nanoparticles, and discussed the challenges and possible solutions in the current research, providing a reference for further research and development of new drugs based on protein nanoparticles.

Keywords: Protein nanoparticles; Albumin; Silk fibroin; Zein; Drug delivery systems

引用: 陈庆鑫, 刘靖杨, 王亚松, 罗沛力, 黄郑炜. 生物来源蛋白纳米递药系统研究进展: 以白蛋白、丝素蛋白和玉米醇溶蛋白为例. 高分子通报, 2025, 38(3), 403–416.

2024-09-16 收稿, 2024-12-09 录用, 2025-01-06 网络出版

[†] 共同第一作者

基金项目: 国家自然科学基金面上项目(基金号 82373800)和广东省中医药局科研项目面上项目(项目号 20241071).

^{*} 通信联系人: 黄郑炜, E-mail: huangzhengw@jnu.edu.cn

doi: 10.14028/j.cnki.1003-3726.2025.24.270

Citation: Chen, Q. X.; Liu, J. Y.; Wang, Y. S.; Luo, P. L.; Huang, Z. W. Research progress on biogenic protein nano-drug delivery systems: taking albumin, silk fibroin and zein as examples. *Polym. Bull.* (in Chinese), 2025, 38(3), 403–416.

纳米粒作为一种能够搭载药物的递药系统^[1],其应用得到广泛的关注。搭载药物的纳米粒可在肿瘤组织处自发积累,这一效应被称为增强渗透性和保留效应(enhanced permeability and retention effect, EPR)^[2],帮助实现纳米靶向给药功能。不溶性药物通过纳米粒递送可改善血液溶解状况,帮助机体吸收完成治疗。众多文献研究显示氧化铁^[3]、脂质体^[4]、聚乳酸^[5]、石墨烯^[6]等丰富多样的纳米粒为药物递送提供了大量可供选择的载体,但无机材料如银纳米粒、金纳米粒等容易在体内积聚产生毒性反应。相较而言,聚乳酸、壳聚糖、水凝胶和蛋白质等纳米有机高分子材料作为载体进行药物递送时,由于其生物相容性和稳定性,且易于制备,引领了纳米递药系统材料研究的潮流^[7]。其中蛋白质纳米粒在来源获取和制备等过程中表现出独特的功能和性质,诸如生物降解性、稳定性、粒径易于控制等,且蛋白质纳米粒在体内可通过内吞作用将药物运输至细胞内,是当前应用最为广泛的高分子纳米材料之一^[8]。目前纳米递药系统除了具备靶向递送药物分子的作用外^[9],还可显著地提高药物的水溶性和稳定性^[10],提高药物在体内的生物利用度^[11],降低药物的使用剂量以减轻副作用,同时蛋白纳米粒在体内可降解、对机体刺激性小,成为众多科学工作者争相研究的对象。

合成纳米粒(包括蛋白纳米粒)的方法包括物理路线和化学路线,这些方法被认为是耗时耗能、成本高昂的,且有毒的化学物质合成纳米粒可能造成二次环境污染,增加了处理成本^[12]。相较于合成纳米粒,生物源性纳米粒可显著减少制备纳米粒过程中造成的环境污染,并且其生产成本低廉,具有可持续性。其中蛋白纳米粒的制备方法主要可分为自上而下法和自下而上法^[13]。但自上而下法由于能耗较高,得到的纳米粒过大,难以得到均匀的粒度分布^[14],在实际应用中不如自下而上法,通过利用蛋白质本身自组装的特性,分子之间相互作用构建了纳米结构,生成的纳米粒性能优异、操作成本低、通用性高,得到了更加广泛的应用。在自下而上法中常用的有去溶剂化法、

盐析法、乳化法、纳米喷雾干燥法、静电纺丝法等(图1)。另外,生物源性纳米粒相比合成纳米粒不易引起机体产生免疫反应,更适合用作递药系统的纳米材料。目前已广泛利用植物、真菌等来生产生物纳米材料^[15,16]。

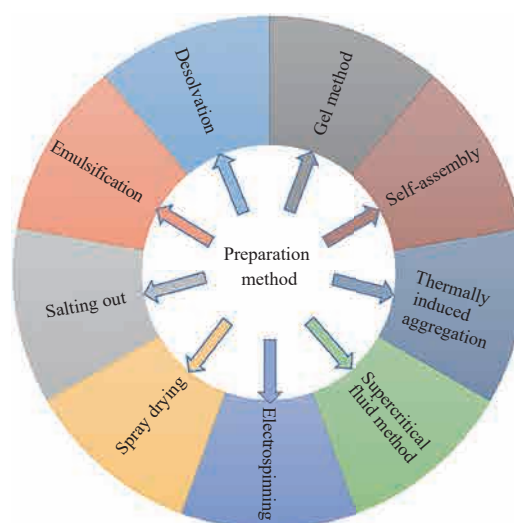


图1 蛋白质纳米粒的常见制备方法

Figure 1 Common preparation methods for protein nanoparticles

生物源性蛋白纳米材料种类繁多,本综述选取了白蛋白纳米粒、丝素蛋白纳米粒和玉米醇溶蛋白纳米粒3种分别来源于人、动物、植物的生物蛋白纳米粒进行介绍;分别概述了这3种不同类型蛋白纳米粒的基本特点、制备方法、应用前景以及当前临床应用存在的难点和可能的解决方案,为后续研究者提供了一定的参考。

1 白蛋白纳米粒(albumin nanoparticles)

1.1 基本特点

最常用的白蛋白(albumin)包括人血清白蛋白(human serum albumin, HSA)和牛血清白蛋白(bovine serum albumin, BSA)2种类型。HSA是一种可溶性球状单体蛋白,由585个氨基酸残基组成,相对分子量为66500,含有35个半胱氨酸残基,形成1个巯基和17个二硫键;BSA含有607个氨

基酸, 相对分子量为69323.4。目前已证实BSA和HSA属于同源蛋白, 其中BSA具有获取成本低、纯化难度小等特点, 被更广泛地用于研究。但相比于HSA, BSA可能会刺激免疫系统, 引起免疫原性反应^[17]。

作为一种多功能的药物递送系统, 也是当前用于临床产品最多的蛋白纳米粒之一, 白蛋白纳米粒可以从人类、动物和植物中获得^[18], 具有强大的稳定性、出色的生物相容性、可生物降解、无毒和非免疫原性等特点^[19], 是肿瘤和炎症治疗中最理想的递药系统。此外, 由于白蛋白纳米粒上存在许多官能团, 药物可以通过不同的机制负载于纳米粒中, 如疏水性药物(紫杉醇)、正电荷药物(银纳米粒子)、负电荷药物(更昔洛韦)、两亲性药物(多柔比星)等^[20], 这也是白蛋白纳米粒可被广泛应用于临床用药开发的原因。

1.2 制备方法

1.2.1 去溶剂化法

去溶剂化法, 又称脱溶剂化法, 是指在不断搅拌的条件下, 向白蛋白水溶液中滴加水溶性有机溶剂使两相混合, 利用蛋白质在有机溶剂中聚集从而制备纳米粒的过程。由于白蛋白不溶于有机溶剂, 因此在将有机溶剂滴加到蛋白质水溶液中时, 白蛋白将聚集并形成颗粒, 此时需要再加入交联剂, 如戊二醛, 以增强纳米粒结构的稳定性从而制得纳米产品^[17](图2)。Solanki等^[21]将乙醇滴入牛血清白蛋白水溶液中, 连续搅拌至观察到溶液呈乳白色。随后在溶液中加入交联剂戊二醛(8%, *V/V*)并继续搅拌以稳定反应体系, 成功制备了粒径为104~116 nm的牛血清白蛋白纳米粒。后续将

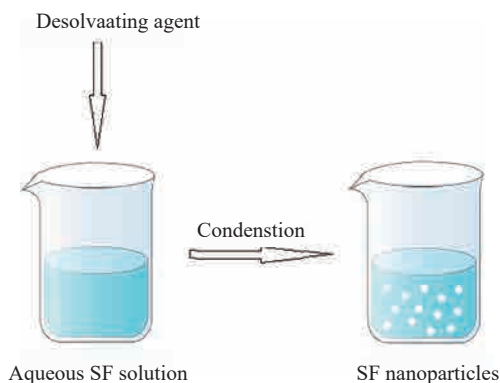


图2 通过反溶剂法制备丝素蛋白纳米粒

Figure 2 Preparation for silk fibroin nanoparticles by anti-solvent method

小槩碱进行包封, 得到了粒径约为110~166 nm、包封率为85.65%的装载小槩碱的牛血清白蛋白纳米粒。

1.2.2 乳化法

乳化法是生产白蛋白纳米粒最成熟而有效的方法之一^[22]。该法首先将白蛋白溶于去离子水中制成白蛋白水溶液; 随后分别加入药物、表面活性剂、有机溶剂等成分使体系达到混合状态, 在高速均质化处理形成不稳定的乳剂体系; 之后为了稳定乳剂体系, 可以利用物理方法(如热稳定法)或者化学方法(如添加交联剂)来进行处理。热稳定法受限于使用条件, 仅适用于对热稳定的药物, 因此在实际应用中, 通过添加交联剂进行稳定的方法更为常见。最后将有机溶剂蒸发或者扩散可形成纳米粒, 进一步冷冻干燥制得白蛋白纳米冻干粉末^[17]。Alfagih等^[23]使用探针超声仪将制备的单乳液乳化到含有10 mg/mL表面活性剂聚乙烯醇(poly(vinyl alcohol), 1% PVA)的外部水相BSA溶液中, 再进行2 h的磁力搅拌以蒸发有机溶剂, 最后得到纳米粒, 其粒径为(445±46.8) nm。将盐酸壳聚糖(chitosan hydrochloride, CHL)加入EAP中, 制备得到杂化阳离子CHL纳米粒。其中杂化阳离子CHL纳米粒尺寸为(480.23±32.20) nm, 包封率为(48.0±2.6)%。

1.2.3 nabTM技术

白蛋白结合技术(nabTM)是一种创新性的用于将亲脂性药物包封在蛋白质基质中以有效靶向递送的技术^[22]。将药物溶于有机溶剂中(如乙酸乙酯), 白蛋白溶于去离子水, 然后将两者混合, 再经过高速匀浆和高压均质化得到稳定的纳米乳液。之后将纳米乳液在真空中旋转蒸发以除去其中的有机溶剂, 最后离心或过滤后, 收集上清液, 冻干处理得到粉末状的白蛋白纳米粒^[24]。该方法的优点在于无需添加常规表面活性剂从而减少了潜在的副作用, 但有机溶剂在真空旋转蒸发后仍然会有残留。Abraxane[®]是使用nabTM技术制备开发的首个药物产品, 它是一种基于白蛋白结合型紫杉醇的纳米制剂, 于2005年获得美国FDA批准^[25], 其平均粒径约为130 nm。另一种基于nabTM技术的产品Fyarro[®]于2021年11月获得批准^[26]。除此之外, Adick等^[27]将市售产品Abraxane[®]与水溶性较差的药物伊曲康唑的白蛋白稳定纳米悬液进行了对比表征, 以确定制备纳米混悬液的关键

参数。他们将伊曲康唑溶于二氯甲烷中,用超纯水将 HSA 溶液进行稀释,使用磁力搅拌器制备由伊曲康唑和白蛋白溶液组成的乳液,并进行高压均质化。之后在 40 °C 下减压通过旋转蒸发移除二氯甲烷,最终制备得到粒径在 180~210 nm 之间的伊曲康唑白蛋白纳米粒。

1.3 应用现状

当前对白蛋白纳米粒的开发主要集中在肿瘤治疗领域,利用白蛋白纳米粒作为药物递送系统,可有效提高药物的药效,用于治疗乳腺癌、肺癌等肿瘤疾病,或者作为抗菌制剂提高抗菌疗效。此外,白蛋白纳米粒具有改善原剂型治疗效果差的特点,可用以开发各种新剂型。相关的应用现状见表 1。

1.3.1 作为药物递送系统

纳米粒可以有效提高药物在体内的生物利用度,从而实现以更小的剂量获得更好的治疗效果,降低药物对机体的副作用。白蛋白纳米粒作为最早获得 FDA 批准的蛋白质纳米粒,制备的紫杉醇-白蛋白纳米粒可用于治疗转移性乳腺癌、胰腺癌和肺癌,避免了大剂量紫杉醇对患者产生过大的毒副作用^[28]。负载干扰素 α 的人血清白蛋白纳米粒(Albupharm)则可用于增强机体免疫力,实现抗病毒、抗肿瘤效果^[29]。除了紫杉醇、干扰素之外,多种药物如姜黄素^[30]、甲氨蝶呤^[31]、氯硝柳胺^[32]等在与白蛋白纳米粒结合后有望用于乳腺癌的靶向治疗。

在其他疾病的治疗中,白蛋白纳米粒作为药物递送系统也展现了其优异性。如作为纳米递药

系统分别包封中性粒细胞弹性蛋白酶(neutrophil elastase, NE)和分泌型白细胞蛋白酶抑制剂(secretory leukocyte protease inhibitors, SLPI)后,这 2 种配方都极大地抑制了铜绿假单胞菌的生长,证明了它们作为抗菌剂和抗组织降解酶保护剂的有效性^[33]。在 BSA 上搭载小檗碱和阿苯达唑用于治疗旋毛虫病时,2 种药物负载在 BSA 上联合使用,加大了对旋毛虫的繁殖抑制,大大提高了疗效^[34]。褪黑素是一种不溶性药物,具有抗氧化和抗凋亡的特性,在与白蛋白纳米粒结合后用于眼部疾病给药,具有很高的潜在开发价值^[35]。因此在抗菌、寄生虫病、眼部疾病等领域,白蛋白纳米粒同样具有广阔的应用前景。

1.3.2 改善已有药物疗效

作为 3 种纳米粒中开发和商用最为成熟的,2005 年 6 月 FDA 批准 Abraxane (含白蛋白纳米粒)用于肿瘤治疗,此后各种基于白蛋白纳米粒的改良药物大量涌现并在临床上取得了优异的成果。由于来源于动物源性的白蛋白纳米粒对人体造成的排斥反应最小,故利用其负载药物分子可有效改善已有药物剂型的药效活性。在与糖尿病治疗药物 Levemir[®]、Victoza[®] 结合后,可有效延长其半衰期以达到更好的治疗效果^[36]。紫杉醇是一种用于治疗乳腺癌的一线药物,通过对比发现白蛋白纳米粒结合紫杉醇对乳腺癌的疗效显著强于溶剂型紫杉醇和脂质体紫杉醇^[37,38],这验证了利用白蛋白纳米粒搭载药物分子以改善原有药物剂型药效的可行性。

表 1 白蛋白纳米粒的相关应用现状

Table 1 Relevant applications of albumin nanoparticles

蛋白来源	应用	涉及蛋白颗粒	转化应用阶段	参考文献
白蛋白	负载紫杉醇治疗乳腺癌,相比其他载体的紫杉醇其改善紫杉醇疗效更强	负载紫杉醇的白蛋白纳米颗粒	已有市售产品 (Abraxane)	[37, 38]
	负载干扰素 α 增强机体免疫、抗病毒、抗肿瘤	负载干扰素 α 的人体血清白蛋白纳米颗粒	已有市售产品 (Albupharm)	[29]
	负载甲氨蝶呤增强体内药物的抗肿瘤活性	甲氨蝶呤-人血清白蛋白纳米颗粒	临床试验	[31]
	增加纳米颗粒对肿瘤细胞的摄取增强抗癌活性	负载姜黄素的白蛋白纳米颗粒	文献研究	[30]
	负载氯硝柳胺作为更好的药物递送系统治疗癌症	负载氯硝柳胺的白蛋白纳米颗粒	文献研究	[32]
	作为纳米载体包封抗菌蛋白酶制成抗菌制剂	负载中性粒细胞弹性蛋白酶和分泌型白细胞蛋白酶的白蛋白纳米颗粒	文献研究	[33]
	作为载药系统治疗旋花虫病	负载阿苯达唑和小檗碱的白蛋白纳米颗粒	文献研究	[34]
	作为载药系统治疗眼部神经性退行疾病	负载褪黑素的白蛋白纳米颗粒	文献研究	[35]
	结合治疗糖尿病药物改善疗效	结合 Levemir [®] 、Victoza [®] 的白蛋白纳米颗粒	文献研究	[36]

1.4 开发难题及潜在解决方案

白蛋白纳米粒当前主要的问题在于, 尽管已经证实BSA和HSA属于同源性血清白蛋白纳米粒, 但BSA的使用具有固有的生物安全风险, 可能传播朊病毒等病理因子, 且BSA对于人体仍会产生一定的免疫排斥反应, 限制了对BSA的进一步开发利用^[39]。建议研究人员可从其编码基因及氨基酸序列、空间结构入手, 对BSA结构进行改造, 以消除可能存在的免疫排斥影响。另外, 通过基因工程改造, 由酵母细胞表达的重组人血清白蛋白(recombinant human serum albumin, rHSA), 有望作为BSA的替代品, 用于白蛋白纳米粒的制备^[40]。

2 丝素蛋白纳米粒(silk fibroin nanoparticles)

2.1 基本特点

丝素蛋白(silk fibroin)是一种来源于动物蚕丝的蛋白, 蚕丝中约25%为丝胶蛋白, 75%为丝素蛋白。蚕丝是一种成熟的纺织纤维, 在纺织工业中广泛使用, 纯化时常使用酶或碱进行脱胶产生不含丝胶的蚕丝基生物材料。蚕丝丝素蛋白在人体中作为缝合丝线使用也有着悠久的历史, 可用于外科手术和伤口缝合的治疗。丝素蛋白具有良好的韧性和机械强度^[41], 可用于制作支架应用于骨组织工程领域^[42]。丝素蛋白纳米粒在体内能够保持稳定、不易破裂, 并且在丝素蛋白上存在易于接近的化学基团可进行功能修饰, 这确保了药物的有效装载和体内释放, 是其相对于其它蛋白纳米材料在药物递送系统领域的关键优势之一。此外, 丝素蛋白纳米粒在动物体内具有极好的生物相容性^[41], 几乎不引起炎症反应; 其降解速率可调控, 在人体内自然降解的代谢产物无毒无害; 分子结构形态灵活多样, 可通过加工工艺调节^[43], 因此被用于装载多种药物如槲皮素、黄芩素、山奈酚等^[44-46], 是一种具有良好临床应用前景的蛋白纳米粒材料。

2.2 制备方法

2.2.1 去溶剂化法

与制备白蛋白纳米粒类似, 去溶剂化法制备丝素蛋白纳米粒时, 通过加入去溶剂促使丝素蛋白的结构构象发生变化, 从而导致蛋白质发生凝聚或沉淀。通过调控制备工艺的操作变量, 如交

联剂种类、蛋白质的浓度等, 可有效控制制取丝素蛋白纳米粒的粒径分布。其中丙酮作为交联剂时生产的纳米粒粒径较小, 分散性也较好。该方法是制备丝素蛋白纳米粒最常用的方法之一^[47]。Moin等^[48]将10 mg他莫昔芬溶解在5 mL二甲基亚砜中, 将所得溶液逐滴加入5 mL SF水溶液里, 以5000 r/min的速度连续搅拌。脱溶后, 将自发形成的TC-SF-NP离心2次以防止聚集。此外, 通过用去离子水洗涤3次以纯化TC-SF-NPs。将纯化的TC-SF-NPs重新分散在去离子水中并进行超声处理以获得所需的尺寸。经过表征, 最终得到平均粒径为(186.1±5.9) nm, 包封率为79.08%, PDI为(0.169±0.01)的TC-SF-NPs。扫描电镜结果显示纳米粒具有球形形态和光滑表面, 体外释放研究及细胞周期分析也表明TC-SF-NPs对肿瘤抑制的效果, 有望用于搭载更低的药物剂量, 取得更有效的治疗效果。

2.2.2 超临界流体法

超临界流体技术是一种利用超临界流体作为介质来实现物质分离和制备纳米粒的先进方法。该方法需使用超临界二氧化碳(scCO₂)作为流体, 可细分为超临界溶液快速膨胀(the rapid expansion of supercritical solutions, RESS)、气体反溶剂(gas antisolvent, GAS)、气溶胶溶剂萃取系统(aerosol solvent extraction systems, ASES)、超临界反溶剂(supercritical antisolvent, SAS)工艺以及超临界流体溶液增强分散(solution-enhanced dispersion by supercritical fluids, SEDS)等^[49]工艺, 其中以SEDS最为常用。其原理是当scCO₂和液体溶液在特定高压环境中接触时, 在交互界面会迅速扩散沉淀, 诱导蛋白质的溶剂相分离和过饱和, 从而导致蛋白质纳米粒的成核与沉淀^[14]。Zhao等^[50]在利用scCO₂的SEDS工艺成功制备了粒径52.5~102.3 nm范围的丝素蛋白纳米粒后, 研究了浓度、流速、温度等工艺参数对粒径和丝素蛋白纳米粒形成机理的影响, 得出增加丝素蛋白溶液的浓度和流速以及沉淀时的温度可增加丝素蛋白纳米粒的粒径和粒径分布, 而提高沉淀压力可减小粒径和粒径分布(最佳粒径52.5 nm, PDI=0.32, 参数流速: 0.5 mL/min, 浓度为0.5%, 沉淀压力为20 MPa, 温度35 °C)。该研究还解释了纳米粒形成的机制, 即由于scCO₂和液体产生的溶液液滴之间的传质驱动, 丝素蛋白核在溶液和scCO₂的

混溶混合物中由于过饱和而生长,最终形成了纳米粒。

2.2.3 盐析法

盐析法是一种与去溶剂化技术极为相似的方法,其原理是在高盐浓度下诱导疏水蛋白质之间发生相互作用来制备蛋白质凝聚物。与去溶剂化法将蛋白质溶液滴加到去溶剂化反应池中相反,盐析是缓慢向蛋白质溶液中添加盐化剂,以制备蛋白纳米粒,这使得其具有相对较高的包封效率,但前提必须确保这一过程不会对蛋白质的结构构象与生物活性产生不可逆的不利影响^[51]。Lammel等^[52]将蚕丝溶液与磷酸钾以1:5的体积比混合盐析,将所得颗粒在冰箱中储存2 h,然后以2000 r/min离心15 min。随后,将颗粒重新分散在纯净水中并洗涤3次,得到蛋白颗粒。研究者发现随着蛋白质浓度的增加,其粒径也随之越大,在0.25~2 mg/mL的浓度范围内,粒径平均直径从486 nm线性增加至1.2 μm ,且粒度分布较窄。

2.3 应用现状

丝素蛋白纳米粒在获得FDA认证后,已成为继白蛋白纳米粒之后有望用于临床使用的生物有机纳米材料之一,其独特的结构性能和生物可降解性使其可作为伤口敷料,用于烧伤、止血、抗菌等的应用;良好的生物相容性使其具有作为药物递送系统的可能性;对机体刺激性小、不刺激免疫系统,可用于体内小血管的移植等。相关应用现状可见表2。

2.3.1 治疗伤口

丝素蛋白从蚕茧中获得,蛋白本身优异的物理性能使得其纳米纤维具有充当外伤敷料的可能。在作为伤口愈合抗菌剂时,将 Ag^+ 固定化在丝素蛋白纳米纤维上作为抗菌活性成分,丝素蛋

白纳米纤维本身则由于足够的机械强度、理化稳定性、良好的生物相容性等特点,可作为敷料使用^[53]。但丝素蛋白纳米纤维本身不具备抗菌抗炎活性,因此仅靠纳米纤维本身无法解决伤口愈合和消毒问题,所以对于伤口的愈合问题需要考虑使用抗炎和抗菌剂如菠萝蛋白酶、氧化锌(ZnO)纳米粒等^[54]。

对于支架类产品而言,在加入丝素蛋白纳米粒后,有效改善了支架的孔径、压缩强度、降解速率等性能变量,相对于纯支架,表现出更好的凝血指数,促进了血小板的粘附,有利于止血和伤口的愈合^[41]。

2.3.2 改善支架或导管性能

丝素蛋白纳米粒具有优异的物理结构性能,并且具备在生物体内的可降解性,因此在制备支架或其他体内应用的生物医疗器械时,通过添加丝素蛋白纳米粒,可大大改善原先支架和导管材料的性能,实现更优异的临床治疗效果。

在丝素蛋白-海藻酸钠支架中混入丝素蛋白纳米粒制成的支架,由于其孔径减小、孔壁变粗、抗压强度增强、降解速度变慢,止血性能得到极大改善,显示出了极大的应用潜力^[41]。细菌纳米纤维素(bacterial nanocellulose, BNC)是一种很有应用前景的小口径人工血管材料,通过加压固定引入丝素蛋白纳米粒和肝素后,极大地改善了细菌纳米纤维导管的性能,可用作小口径血管移植,在临床应用中具有巨大的潜力^[55]。

2.3.3 作为新型给药系统

丝素蛋白纳米粒本身良好的生物相容性是作为纳米递药系统的前提,尽管尚不能像白蛋白纳米粒那样得到大量的临床应用,但在搭载各类药物分子作为给药系统的研究方面已获得了广泛的关注。

表2 丝素蛋白纳米粒应用现状

Table 2 Relevant applications of silk fibroin nanoparticles

蛋白来源	应用	涉及蛋白颗粒	转化应用阶段	参考文献
丝素蛋白	抗菌抗炎烧伤敷料	负载氧化锌或水凝胶的丝素蛋白纳米纤维	已有市售产品(浙江星月生物:II类器械「丝素蛋白凝胶敷料,丝素蛋白膜状敷料」)	[54]
	递送小分子药物	负载槲皮素、姜黄素、丝水凝胶(荧光染料)等小分子药物的丝素蛋白纳米颗粒	文献研究	[56~58]
	负载抗肿瘤药物增强抗肿瘤疗效	负载紫杉醇、姜黄素的丝素蛋白纳米颗粒	文献研究	[58, 59]
	改善止血性能	丝素蛋白-海藻酸钠纳米颗粒支架	文献研究	[41]
	用于血管移植	肝素化细菌丝素蛋白纳米纤维	文献研究	[55]

丝素蛋白纳米粒可以搭载大分子药物如多肽、蛋白质等, Hasannasab 等^[54]将菠萝蛋白酶固定在丝素蛋白纳米纤维上, 用于抗菌和抗炎烧伤的治疗, 研究表明可显著促进伤口的愈合并显著降低伤口的炎症反应。同样的丝素蛋白纳米粒也可搭载多种小分子药物如槲皮素^[56]、丝水凝胶^[57]、姜黄素等^[58], 或者荧光染料作为模型药物进行观察研究^[57], 这改善了药物原本无靶向性、毒副作用强、直接使用生物利用度低等不足。此外, 丝素蛋白纳米粒同样可以搭载抗癌药物如紫杉醇、姜黄素等用于抗癌治疗。负载紫杉醇的丝素蛋白纳米粒通过局部区域给药递送增强了抗肿瘤疗效^[59]; 将负载姜黄素的壳聚糖纳米粒封装于丝素蛋白/甲基丙烯酸酯透明质酸(CCNPs-SF/HAMA)水凝胶中, 制得的姜黄素丝素蛋白纳米粒在局部骨肉瘤癌症治疗和骨再生中表现出极佳的效果^[60]。

2.4 开发难题及潜在解决方案

丝素蛋白纳米粒虽然有望成为继白蛋白纳米粒后又一临床应用的蛋白纳米材料, 但其制备周期相对较长, 苛刻的制备工艺、交联剂的大量使用也限制了进一步应用。另外, 不同生物来源的丝素蛋白存在差异性, 如天然蛛丝蛋白的可用性存在限制, 多使用重组蛛丝蛋白替代^[61]。丝素蛋白纳米粒的提取和制备尚停留于实验室制备阶段, 暂无成熟的工业化生产出现。值得注意的是, 有研究指出利用基因加工和重组后的蛛丝丝素蛋白纳米粒作为给药系统时, 制备工艺得到了优化, 药物也实现了稳定释放^[62], 有望成为一种可靠的解决方案。

3 玉米醇溶蛋白纳米粒 (zein nanoparticles)

3.1 基本特点

玉米醇溶蛋白又称为玉米蛋白, 是玉米的贮藏蛋白, 富集于玉米种子胚乳的蛋白体中。玉米醇溶蛋白富含非极性和不带电的氨基酸, 如谷氨酰胺(21%~26%)、亮氨酸(20%)、脯氨酸(10%)和丙氨酸(10%)。这些氨基酸组成赋予了玉米醇溶蛋白纳米粒独特的物理化学性质, 其中疏水性氨基酸占比超过 50%, 导致玉米醇溶蛋白纳米粒的水溶性极差, 但相对的玉米醇溶蛋白纳米粒可以很容易地溶于 60%~95% 的乙醇水溶液中^[63], 玉米醇溶蛋白的这种两亲性, 使得它具有很强的自组

装能力, 可以组装成各种结构的纳米粒以包封和递送生物活性成分^[64], 如球形、管状或纤维状, 同时玉米醇溶蛋白独特的氨基酸组成使其成为一种用于封装疏水性生物活性化合物的理想纳米药物递送材料^[65]。玉米醇溶蛋白的生物相容性和生物降解性也是其在药物递送系统领域的优势, 它与丝素蛋白纳米粒一样具有可靠的物理结构性能, 并且玉米醇溶蛋白纳米粒的成本更加低廉, 容易大规模生产, 这使得玉米醇溶蛋白纳米粒成为一种独特的药物递送材料, 具有强大的潜在研究价值和开发应用前景。

3.2 制备方法

3.2.1 反溶剂法

反溶剂法是一种基于 2 种可混溶溶剂进行操作的方法, 已在工业生产中得到广泛应用。其中一种溶剂用以溶解药物, 另一种作为反溶剂。溶质必须只溶于一种溶剂, 当加入反溶剂之后, 混合体系内溶质的溶解度降低, 最终导致溶质以纳米晶体的形式析出^[66]。该方法不需要专门的设备和复杂的生产条件, 降低了生产成本, 同时减少了环境污染, 在工业生产中备受欢迎^[67]。以玉米醇溶蛋白为例, 在 Yuan 等的研究中^[68], 将难溶于水的玉米醇溶蛋白利用乙醇-水(80%, *V/V*)溶解后, 制成储备液, 再将玉米醇溶蛋白储备溶液滴入去离子水中, 形成玉米醇溶蛋白纳米粒, 在此过程中, 乙醇充当了反溶剂的角色, 最后被旋蒸除去后与药物溶液混溶搅拌, 形成玉米醇溶蛋白/药物复合纳米粒。在 pH=4.0 条件下, 玉米醇溶蛋白纳米粒的平均粒径为 123 nm, PDI<0.2, 且对药物具有良好的稳定作用。这一研究表明玉米醇溶蛋白纳米粒可通过硫酸软骨素稳定, 且稳定后表现出良好的 pH 值和热稳定性, 有望为探索硫酸软骨素与其他植物来源的蛋白质材料之间的相互作用提供有用的信息。

3.2.2 pH 驱动法

玉米醇溶蛋白在碱性条件下(pH>11)溶解度较高, 而在酸性和中性条件中溶解度较差, 基于这一原理开发出了 pH 驱动法。将玉米醇溶蛋白溶解在去离子水中并用氢氧化钠(NaOH)调节 pH 至 12, 然后用盐酸(HCl)将 pH 调回 7, 在 pH 变化的过程中, 玉米醇溶蛋白的氨基酸残基被质子化, 在其溶解度逐渐降低的同时开始聚集形成颗粒, 将疏水性药物成分包封在颗粒内^[69]。Zheng 等^[70]

采用pH驱动法制备了负载有香芹酚(carvacrol)的玉米醇溶蛋白/酪蛋白酸钠复合纳米粒,得到的颗粒为球形,粒径在50~200 nm左右,包封率为77.96%~82.19%。Yuan等^[71]未使用任何有机试剂和高能设备而采用pH驱动法制备了负载有姜黄素的玉米醇溶蛋白/茶皂苷复合纳米粒,颗粒呈球形,粒径约为100~250 nm, PDI<0.3,在pH=5.0~8.0、80 °C下表现出良好的稳定性,25 °C下可保存30天,姜黄素的包封率和负载量分别为83.73%和22.33%。

3.2.3 电喷雾法

电流体动力雾化(electrohydrodynamic atomization, EHDA)是用于制备单分散纳米粒的技术。EHDA在电场的作用下,将液体分解成微小的带点液滴,再通过细金属管时产生电喷雾现象,根据电场强度、流量和液体特性实现不同喷涂模式,从而得到窄尺寸分布的不同直径的纳米粒^[72]。Yang等^[73]使用电喷雾法对玉米醇溶蛋白进行物理改性,所生产的颗粒为球形,平均尺寸为2000 nm(亚微米级),这一研究拓展了电喷雾法在玉米醇溶蛋白纳米粒制备上的应用,为食品、药品输送系统的构建提供参考。

3.3 应用现状

目前对于玉米醇溶蛋白纳米粒的开发仍处于前期阶段,但其用于药物开发领域的应用潜力巨大,当前与医药相关的应用主要是将玉米淀粉作为片剂、胶囊剂等制备过程添加的辅料。已有的研究指出了玉米醇溶蛋白纳米粒可作为伤口敷料、纳米给药系统,以及其他需要应用生物医用材料的领域,显示出了其后续实现进一步开发的可能性。相关的应用现状可见表3。

3.3.1 伤口敷料

在外伤敷料领域,壳聚糖、明胶等材料已得到大量的应用,玉米醇溶蛋白由于具有抗菌、抗氧化等属性,同样具备成为优异的伤口敷料的可

能。玉米醇溶蛋白负载鞣花酸纳米粒可以作为治疗伤口的敷料,所有薄膜材料均促进了鞣花酸的持续释放,并显示出对白色念珠菌、金黄色葡萄球菌和铜绿假单胞菌极好的抑制活性^[74]。将他达拉非负载的玉米醇溶蛋白纳米粒掺入果胶/PVA纳米纤维中,可作为糖尿病伤口敷料,显著促进了糖尿病伤口的愈合^[75]。

3.3.2 作为药物递送系统

玉米醇溶蛋白纳米粒可以充当递送植物化学药物、细胞毒性药物、抗菌抗氧化药物、抗炎药物等多种类型的药物递送系统。使用玉米醇溶蛋白纳米粒作为递药系统进行血糖控制的研究已进入临床试验阶段(NCT05560412)。相比于固体玉米醇溶蛋白纳米粒,中空的玉米醇溶蛋白纳米粒的药物释放表现出更持续和受控的方式,可用于将药物递送至细胞^[76]。具有稳定的双涂层结构的负载姜黄素的玉米醇溶蛋白纳米粒,显著提高了姜黄素的光化学稳定性和抗氧化活性,在制药工业中可作为疏水性药物的递送系统^[77]。相比于游离的DOX(doxorubicin),负载多柔比星的玉米醇溶蛋白纳米粒(DOX-zein-NPs)在低浓度下对癌细胞具有更好的杀伤作用,小尺寸的纳米粒(约50 nm)可以进入细胞质和细胞核,可被视为癌症治疗的一种有前景的药物递送系统^[78]。负载漆树酸的玉米醇溶蛋白纳米粒能够有效地杀菌,对多种细菌的抗菌性显著增强,稳定性也有所增加。玉米醇溶蛋白-果胶核/壳纳米粒显著提高了白藜芦醇的生物利用度和抗炎活性,这一口服递送系统特别适用在功能性食品或药品中的应用^[77]。香芹酚(carvacrol, CV)由于水溶性低和生物利用度差而限制了其应用,玉米醇溶蛋白上存在两个可与CV结合的活性位点,将CV掺入卵磷脂稳定的玉米醇溶蛋白纳米粒后,可以通过口服途径方便地递送,并且证明了其有望用于对结肠癌的治疗^[79]。

表3 玉米醇溶蛋白纳米粒的应用现状

Table 3 Relevant applications of zein nanoparticles

蛋白来源	应用	涉及蛋白颗粒	转化应用阶段	参考文献
玉米蛋白	作为降糖药物使用	玉米醇溶蛋白纳米胶囊	临床试验	NCT05560412*
	可以作为各种疾病的伤口敷料	负载鞣花酸、他达拉非的玉米蛋白纳米颗粒	文献研究	[74, 75]
	递送植物化学药物	负载姜黄素的玉米蛋白纳米颗粒	文献研究	[77]
	递送细胞毒性药物	负载多柔比星的玉米蛋白纳米颗粒	文献研究	[78]
	递送抗癌药物	负载单萜香芹酚的玉米蛋白颗粒	文献研究	[79]

*NCT是National Clinical Trial(国家临床试验)的缩写,以其为开头的编号代表临床试验的唯一识别号码。

3.4 开发难题及潜在解决方案

玉米醇溶蛋白纳米粒在水溶液中不稳定^[80,81], 并且在水中容易聚集, 对消化系统中的酶降解敏感, 使得当前的制备方法存在局限^[82], 高效制备具有可调理化性质的稳定玉米醇溶蛋白纳米粒仍然具有挑战性。克服其局限性的一种策略是利用多糖作为第二层聚合物层, 为玉米醇溶蛋白纳米粒增加稳定性^[82]。尽管玉米醇溶蛋白纳米粒被广泛认为是一种具有应用前景的纳米递药系统, 但鲜有相关的临床研究证实这一点, 因此亟需获得临床研究许可, 以确定玉米醇溶蛋白纳米粒的安全性和可用性。

4 总结和展望

蛋白质纳米粒因具有可靶向递送药物分子、良好的生物相容性和降解性、对机体刺激小等优点从众多高分子纳米材料中脱颖而出。相较于合成纳米粒, 生物来源的蛋白质纳米粒在制备过程中可显著减少环境污染和降低成本, 不易引起机体的免疫反应。蛋白纳米粒的制备方法主要可分为自上而下法和自下而上法^[13]。相较于前者, 自下而上法生成的纳米粒性能优异、操作成本低、通用性高, 得到了更加广泛的利用。目前去溶剂法在实验室制备蛋白质纳米粒过程中应用较为广泛, 是丝素蛋白和玉米醇溶蛋白制备最常用的方法, 而乳化法则是生产白蛋白纳米粒最成熟有效的方法。

作为最早获得FDA批准用于临床使用的蛋白质纳米粒, 白蛋白纳米粒在肿瘤治疗领域已得到了广泛的应用, Abraxane、Albuzon等多款抗肿瘤产品的成功开发上市, 使得白蛋白纳米粒逐渐成为临床治疗肿瘤的有效手段; 负载已有药物以改善原药物剂型的不足以及提高药物治疗疗效的研究也不断展开中。丝素蛋白纳米粒优异的结构性能和生物可降解性使得其既可以在体外应用, 通过搭载药物用于抗炎、抗菌, 促进伤口愈合, 又能在支架或导管的制备过程中加入, 以改善原产品的物理性能, 从而达到更好的治疗效果。并且由于其生物相容性, 丝素蛋白纳米粒作为纳米给药系统搭载药物用于体内外给药, 同样具有与白蛋白纳米粒相当的应用前景, 有望进一步开发实现真正的临床应用。玉米醇溶蛋白作为一种获得FDA批准的“Generally Regarded as Safe”的生

物医学应用材料, 同样具有巨大的潜在应用价值, 其相关的临床前研究也已取得突出的成果, 在作为外伤敷料、纳米给药系统等多个医用领域表现出了极佳的可用性, 具有潜在的开发价值。

相对于应用较多的白蛋白纳米粒, 丝素蛋白纳米粒和玉米醇溶蛋白纳米粒具有独特的物理特性, 具备开发成为外用伤口敷料的潜力, 从而在抗菌抗炎、伤口止血愈合等领域发挥作用。此外, 丝素蛋白可掺入支架等生物医用材料中改善原有产品的物理性能, 而玉米醇溶蛋白因为成本低廉, 可以实现大规模生产。当然, 3种蛋白质纳米粒具有同一优势, 即均可有效包封疏水性药物且提高其生物利用度。

但BSA对人体存在一定的免疫排斥反应而限制了其应用, 可通过对BSA进行结构改造以消除免疫排斥影响; 另外, 通过基因工程改造得到的rHSA亦有望作为BSA的替代品, 用于白蛋白纳米粒的制备。丝素蛋白纳米粒的提取和制备暂未进入成熟的工业化生产阶段, 不同来源的丝素蛋白存在差异性, 通过基因加工和重组丝素蛋白替代使用或可解决; 玉米醇溶蛋白在水溶液中稳定性差并且容易聚集, 对消化系统中的酶降解敏感也使得其进一步应用受到限制, 通过利用其它材料对玉米醇溶蛋白纳米粒进行二层包封或可改善纳米粒的稳定性。

在3种不同生物来源的纳米粒中, 上述特性使得各类蛋白质纳米粒递药系统有了进一步开发的可能性, 我们期待通过研究人员的不懈努力, 在未来可以实现丝素蛋白纳米粒和玉米醇溶蛋白纳米粒的临床产品落地, 使其成为继白蛋白纳米粒之后被成功应用于临床实践中的蛋白纳米材料, 促进纳米给药领域的发展。

参考文献

- 1 Kianfar, E. Protein nanoparticles in drug delivery: animal protein, plant proteins and protein cages, albumin nanoparticles. *J. Nanobiotechnology*, **2021**, 19(1), 159.
- 2 Matsumura, Y.; Maeda, H. A new concept for macromolecular therapeutics in cancer chemotherapy: mechanism of tumoritropic accumulation of proteins and the antitumor agent smancs. *Cancer Res.*, **1986**, 46(12 Pt 1), 6387–6392.
- 3 Vaezi-Kakhki, A.; Asoodeh, A. Comparison of different

- methods for synthesis of iron oxide nanoparticles and investigation of their cellular properties, and antioxidant potential. *Int. J. Pharm.*, **2023**, 645, 123417.
- 4 Dattani, S.; Li, X. L.; Lampa, C.; Lechuga-Ballesteros, D.; Barriscale, A.; Damadzadeh, B.; Jasti, B. R. A comparative study on micelles, liposomes and solid lipid nanoparticles for paclitaxel delivery. *Int. J. Pharm.*, **2023**, 631, 122464.
 - 5 Yang, C.; Yang, S. S.; Fang, S. M.; Li, L. S.; Jing, J. C.; Liu, W. T.; Wang, C.; Li, R. X.; Lu, Y. PLGA nanoparticles enhanced cardio-protection of scutellarin and paeoniflorin against isoproterenol-induced myocardial ischemia in rats. *Int. J. Pharm.*, **2023**, 648, 123567.
 - 6 Targhazeh, N.; Maleki, M.; Alemi, F.; Yousefi, B. Enhanced drug loading capacity of graphene oxide nanoparticles by polyglycerol hyper branching and increasing the sensitivity of osteosarcoma cancer cells to doxorubicin. *J. Drug Deliv. Sci. Technol.*, **2023**, 88, 104871.
 - 7 Asil, S. M.; Ahlawat, J.; Barroso, G. G.; Narayan, M. Nanomaterial based drug delivery systems for the treatment of neurodegenerative diseases. *Biomater. Sci.*, **2020**, 8(15), 4109–4128.
 - 8 Hong, S.; Choi, D. W.; Kim, H. N.; Park, C. G.; Lee, W.; Park, H. H. Protein-based nanoparticles as drug delivery systems. *Pharmaceutics*, **2020**, 12(7), 604.
 - 9 Wang, B.; Shen, J. Q.; Wang, X. G.; Hou, R. X. Biomimetic nanoparticles for effective Celestrol delivery to targeted treatment of rheumatoid arthritis through the ROS-NF- κ B inflammasome axis. *Int. Immunopharmacol.*, **2024**, 131, 111822.
 - 10 Liu, H.; Zhang, Y.; Zhang, J. B.; Xiong, Y.; Peng, S. F.; McClements, D. J.; Zou, L. Q.; Liang, R. H.; Liu, W. Utilization of protein nanoparticles to improve the dispersibility, stability, and functionality of a natural pigment: norbixin. *Food Hydrocoll.*, **2022**, 124, 107329.
 - 11 Woo, M. R.; Bak, Y. W.; Cheon, S.; Kim, J. S.; Ji, S. H.; Park, S.; Woo, S.; Kim, J. O.; Jin, S. G.; Choi, H. G. Modification of microenvironmental pH of nanoparticles for enhanced solubility and oral bioavailability of poorly water-soluble celecoxib. *Int. J. Pharm.*, **2024**, 659, 124179.
 - 12 Ali Qamar, O.; Jamil, F.; Hussain, M.; Bae, S.; Inayat, A.; Shah, N. S.; Waris, A.; Akhter, P.; Kwon, E. E.; Park, Y. K. Advances in synthesis of TiO₂ nanoparticles and their application to biodiesel production: a review. *Chem. Eng. J.*, **2023**, 460, 141734.
 - 13 Pham, D. T.; Tiyafoonchai, W. Fibroin nanoparticles: a promising drug delivery system. *Drug Deliv.*, **2020**, 27(1), 431–448.
 - 14 Zhao, Z.; Li, Y.; Xie, M. B. Silk fibroin-based nanoparticles for drug delivery. *Int. J. Mol. Sci.*, **2015**, 16(3), 4880–4903.
 - 15 Lashin, I.; Fouda, A.; Gobouri, A. A.; Azab, E.; Mohammedsaleh, Z. M.; Makharia, R. R. Antimicrobial and *in vitro* cytotoxic efficacy of biogenic silver nanoparticles (Ag-NPs) fabricated by callus extract of *Solanum incanum* L. *Biomolecules*, **2021**, 11(3), 341.
 - 16 Morad, M. Y.; El-Sayed, H.; Elhenawy, A. A.; Korany, S. M.; Aloufi, A. S.; Ibrahim, A. M. Myco-synthesized molluscicidal and larvicidal selenium nanoparticles: a new strategy to control *Biomphalaria alexandrina* snails and larvae of *Schistosoma mansoni* with an *in silico* study on induced oxidative stress. *J. Fungi*, **2022**, 8(3), 262.
 - 17 Lamichhane, S.; Lee, S. Albumin nanoscience: homing nanotechnology enabling targeted drug delivery and therapy. *Arch. Pharm. Res.*, **2020**, 43(1), 118–133.
 - 18 Hornok, V. Serum albumin nanoparticles: problems and prospects. *Polymers*, **2021**, 13(21), 3759.
 - 19 Shen, X.; Liu, X. Y.; Li, T. T.; Chen, Y.; Chen, Y.; Wang, P.; Zheng, L.; Yang, H.; Wu, C. H.; Deng, S. Q.; Liu, Y. Y. Recent advancements in serum albumin-based nanovehicles toward potential cancer diagnosis and therapy. *Front. Chem.*, **2021**, 9, 746646.
 - 20 Tanjung, Y. P.; Dewi, M. K.; Gatera, V. A.; Barliana, M. I.; Joni, I. M.; Chaerunisaa, A. Y. Factors affecting the synthesis of bovine serum albumin nanoparticles using the desolvation method. *Nanotechnol. Sci. Appl.*, **2024**, 17, 21–40.
 - 21 Solanki, R.; Patel, K.; Patel, S. Bovine serum albumin nanoparticles for the efficient delivery of berberine: preparation, characterization and *in vitro* biological studies. *Colloids Surf. A Physicochem. Eng. Aspects*, **2021**, 608, 125501.
 - 22 Srivastava, A.; Prajapati, A. Albumin and functionalized albumin nanoparticles: production strategies, characterization, and target indications. *Asian Biomed.*, **2020**, 14(6), 217–242.
 - 23 Alfagih, I. M.; Kaneko, K.; Kunda, N. K.; Alanazi,

- F.; Dennison, S. R.; Tawfeek, H. M.; Saleem, I. Y. *In vitro* characterization of inhalable cationic hybrid nanoparticles as potential vaccine carriers. *Pharmaceuticals*, **2021**, 14(2), 164.
- 24 Stein, N. C.; Mulac, D.; Fabian, J.; Herrmann, F. C.; Langer, K. Nanoparticle albumin-bound mTHPC for photodynamic therapy: preparation and comprehensive characterization of a promising drug delivery system. *Int. J. Pharm.*, **2020**, 582, 119347.
- 25 Desai, N.; Trieu, V.; Yao, Z.; Louie, L.; Ci, S.; Yang, A.; Tao, C.; De, T.; Beals, B.; Dykes, D.; Noker, P.; Yao, R.; Labao, E.; Hawkins, M.; Soon-Shiong, P. Increased antitumor activity, intratumor paclitaxel concentrations, and endothelial cell transport of cremophor-free, albumin-bound paclitaxel, ABI-007, compared with cremophor-based paclitaxel. *Clin. Cancer Res.*, **2006**, 12(4), 1317–1324.
- 26 Meredith, L.; Chao, T.; Nevler, A.; Basu Mallick, A.; Singla, R. K.; McCue, P. A.; Bowne, W. B.; Jiang, W. A rare metastatic mesenteric malignant PEComa with TSC2 mutation treated with palliative surgical resection and nab-sirolimus: a case report. *Diagn. Pathol.*, **2023**, 18(1), 45.
- 27 Adick, A.; Hoheisel, W.; Schneid, S.; Mulac, D.; Azhdari, S.; Langer, K. Challenges of nanoparticle albumin bound (nab™) technology: Comparative study of abraxane® with a newly developed albumin-stabilized itraconazole nanosuspension. *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, **2023**, 193, 129–143.
- 28 Li, B. X.; Chen, X. J.; Ding, T. J.; Liu, Y. H.; Ma, T. T.; Zhang, G. L.; Wang, X. M. Potentially overestimated efficacy of nanoparticle albumin-bound paclitaxel compared with solvent-based paclitaxel in breast cancer: a systemic review and meta-analysis. *J. Cancer*, **2021**, 12(17), 5164–5172.
- 29 Miroshnichenko, S.; Pykhtina, M.; Kotliarova, A.; Chepurnov, A.; Beklemishev, A. Engineering a new IFN-ApoA-I fusion protein with low toxicity and prolonged action. *Molecules*, **2023**, 28(24), 8014.
- 30 Türkes, E.; Sağ Açıklık, Y. Folic acid-conjugated cancer drug curcumin-loaded albumin nanoparticles: investigation of curcumin release kinetics. *J. Drug Deliv. Sci. Technol.*, **2024**, 91, 105178.
- 31 Mohammadhassan, Z.; Mohammadkhani, R.; Mohammadi, A.; Zaboli, K. A.; Kaboli, S.; Rahimi, H.; Nosrati, H.; Danafar, H. Preparation of copper oxide nanoparticles coated with bovine serum albumin for delivery of methotrexate. *J. Drug Deliv. Sci. Technol.*, **2022**, 67, 103015.
- 32 Rejinold N, S.; Choi, G.; Piao, H.; Choy, J. H. Bovine serum albumin-coated niclosamide-zein nanoparticles as potential injectable medicine against COVID-19. *Materials*, **2021**, 14(14), 3792.
- 33 Tarhini, M.; Pizzoccaro, A.; Benlyamani, I.; Rebaud, C.; Greige-Gerges, H.; Fessi, H.; Elaissari, A.; Bentaher, A. Human serum albumin nanoparticles as nanovector carriers for proteins: application to the antibacterial proteins “neutrophil elastase” and “secretory leukocyte protease inhibitor”. *Int. J. Pharm.*, **2020**, 579, 119150.
- 34 El-Wakil, E. S.; Khodear, G. A. M.; Ahmed, H. E. S.; Ibrahim, G. I. K.; Hegab, F.; Abdo, S. M. Therapeutic efficacy of albendazole and berberine loaded on bovine serum albumin nanoparticles on intestinal and muscular phases of experimental trichinellosis. *Acta Trop.*, **2023**, 241, 106896.
- 35 Mickaela Martinez, S.; Inda, A.; Marina Garcia, A.; María Bermúdez, J.; Emilio Gonzo, E.; Herrero-Vanrell, R.; Domingo Luna, J.; Alberto Allemandi, D.; Alejandra Quinteros, D. Development of melatonin-loaded, human-serum-albumin nanoparticles formulations using different methods of preparation for ophthalmic administration. *Int. J. Pharm.*, **2022**, 628, 122308.
- 36 Kunde, S. S.; Wairkar, S. Targeted delivery of albumin nanoparticles for breast cancer: a review. *Colloids Surf. B Biointerfaces*, **2022**, 213, 112422.
- 37 Zhang, W. W.; Wang, Y.; He, J. Z.; Xu, Y. G.; Chen, R.; Wan, X. Y.; Shi, W. J.; Huang, X. F.; Xu, L.; Wang, J.; Zha, X. M. Efficacy comparisons of solvent-based paclitaxel, liposomal paclitaxel, nanoparticle albumin-bound paclitaxel, and docetaxel after neoadjuvant systemic treatment in breast cancer. *Nanomed. Nanotechnol. Biol. Med.*, **2023**, 54, 102707.
- 38 Gawde, K. A.; Sau, S.; Tatiparti, K.; Kashaw, S. K.; Mehrmohammadi, M.; Azmi, A. S.; Iyer, A. K. Paclitaxel and di-fluorinated curcumin loaded in albumin nanoparticles for targeted synergistic combination therapy of ovarian and cervical cancers. *Colloids Surf. B Biointerfaces*, **2018**, 167, 8–19.
- 39 Xu, X. H.; Hu, J. Y.; Xue, H. Q.; Hu, Y. Y.; Liu, Y. N.; Lin, G. Y.; Liu, L. L.; Xu, R. N. Applications of human and bovine serum albumins in biomedical engineering: a review. *Int. J. Biol. Macromol.*, **2023**, 253, 126914.

- 40 Chen, S. S.; Han, Y. Q.; Ouyang, Q. C.; Lu, J. G.; Zhang, Q. Y.; Yang, S. E.; Wang, J. F.; Huang, H. X.; Liu, H.; Shao, Z. M.; Li, H.; Chen, Z. D.; Sun, S. Y.; Geng, C. Z.; Lu, J. G.; Sun, J. W.; Wang, J. Y.; Xu, B. H. Randomized and dose-escalation trials of recombinant human serum albumin/granulocyte colony-stimulating factor in patients with breast cancer receiving anthracycline-containing chemotherapy. *BMC Cancer*, **2021**, 21(1), 341.
- 41 Shen, Y.; Wang, X. Y.; Li, B. B.; Guo, Y. J.; Dong, K. Development of silk fibroin-sodium alginate scaffold loaded silk fibroin nanoparticles for hemostasis and cell adhesion. *Int. J. Biol. Macromol.*, **2022**, 211, 514–523.
- 42 Luetchford, K. A.; Chaudhuri, J. B.; De Bank, P. A. Silk fibroin/gelatin microcarriers as scaffolds for bone tissue engineering. *Mater. Sci. Eng. C*, **2020**, 106, 110116.
- 43 Lyu, H.; Li, J. H.; Yuan, Z. C.; Liu, H. R.; Sun, Z. Y.; Jiang, R.; Yu, X.; Hu, Y.; Pei, Y.; Ding, J.; Shen, Y.; Guo, C. C. Supertough and highly stretchable silk protein-based films with controlled biodegradability. *Acta Biomater.*, **2022**, 153, 149–158.
- 44 Liu, S.; Gao, X. T.; Wang, Y. Q.; Wang, J.; Qi, X. J.; Dong, K. H.; Shi, D. Y.; Wu, X. C.; Guo, C. L. Baicalein-loaded silk fibroin peptide nanofibers protect against cisplatin-induced acute kidney injury: fabrication, characterization and mechanism. *Int. J. Pharm.*, **2022**, 626, 122161.
- 45 Yang, W. J.; Xie, D. C.; Liang, Y. Q.; Chen, N. X.; Xiao, B.; Duan, L.; Wang, M. Multi-responsive fibroin-based nanoparticles enhance anti-inflammatory activity of kaempferol. *J. Drug Deliv. Sci. Technol.*, **2022**, 68, 103025.
- 46 Diez-Echave, P.; Ruiz-Malagón, A. J.; Molina-Tijeras, J. A.; Hidalgo-García, L.; Vezza, T.; Cenis-Cifuentes, L.; Rodríguez-Sojo, M. J.; Cenis, J. L.; Rodríguez-Cabezas, M. E.; Rodríguez-Nogales, A.; Gálvez, J.; Lozano-Pérez, A. A. Silk fibroin nanoparticles enhance quercetin immunomodulatory properties in DSS-induced mouse colitis. *Int. J. Pharm.*, **2021**, 606, 120935.
- 47 Lohcharoenkal, W.; Wang, L. Y.; Chen, Y. C.; Rojanasakul, Y. Protein nanoparticles as drug delivery carriers for cancer therapy. *BioMed Res. Int.*, **2014**, 2014(1), 180549.
- 48 Moin, A.; Wani, S. U. D.; Osmani, R. A.; Abu Lila, A. S.; Khafagy, E. S.; Arab, H. H.; Gangadharappa, H. V.; Allam, A. N. Formulation, characterization, and cellular toxicity assessment of tamoxifen-loaded silk fibroin nanoparticles in breast cancer. *Drug Deliv.*, **2021**, 28(1), 1626–1636.
- 49 Tran, P.; Park, J. S. Application of supercritical fluid technology for solid dispersion to enhance solubility and bioavailability of poorly water-soluble drugs. *Int. J. Pharm.*, **2021**, 610, 121247.
- 50 Zhao, Z.; Li, Y.; Chen, A. Z.; Zheng, Z. J.; Hu, J. Y.; Li, J. S.; Li, G. Generation of silk fibroin nanoparticles via solution-enhanced dispersion by supercritical CO₂. *Ind. Eng. Chem. Res.*, **2013**, 52(10), 3752–3761.
- 51 Jain, A.; Singh, S. K.; Arya, S. K.; Kundu, S. C.; Kapoor, S. Protein nanoparticles: promising platforms for drug delivery applications. *ACS Biomater. Sci. Eng.*, **2018**, 4(12), 3939–3961.
- 52 Lammel, A. S.; Hu, X.; Park, S. H.; Kaplan, D. L.; Scheibel, T. R. Controlling silk fibroin particle features for drug delivery. *Biomaterials*, **2010**, 31(16), 4583–4591.
- 53 Khan, R. S.; Rather, A. H.; Wani, T. U.; Rather, S. U.; Abdal-hay, A.; Sheikh, F. A. A comparative review on silk fibroin nanofibers encasing the silver nanoparticles as antimicrobial agents for wound healing applications. *Mater. Today Commun.*, **2022**, 32, 103914.
- 54 Hasannasab, M.; Nourmohammadi, J.; Dehghan, M. M.; Ghaee, A. Immobilization of bromelain and ZnO nanoparticles on silk fibroin nanofibers as an antibacterial and anti-inflammatory burn dressing. *Int. J. Pharm.*, **2021**, 610, 121227.
- 55 Bao, L. H.; Hong, F. F.; Li, G. L.; Hu, G. Q.; Chen, L. Improved performance of bacterial nanocellulose conduits by the introduction of silk fibroin nanoparticles and heparin for small-caliber vascular graft applications. *Biomacromolecules*, **2021**, 22(2), 353–364.
- 56 Tang, Y.; Zhang, L. F.; Sun, R.; Luo, B. Y.; Zhou, Y.; Zhang, Y.; Liang, Y. Q.; Xiao, B.; Wang, C. H. Pulmonary delivery of mucus-traversing PF127-modified silk fibroin nanoparticles loading with quercetin for lung cancer therapy. *Asian J. Pharm. Sci.*, **2023**, 18(4), 100833.
- 57 Numata, K.; Yamazaki, S.; Naga, N. Biocompatible and biodegradable dual-drug release system based on silk hydrogel containing silk nanoparticles. *Biomacromolecules*, **2012**, 13(5), 1383–1389.
- 58 Gou, S. Q.; Huang, Y. M.; Wan, Y.; Ma, Y.; Zhou, X.; Tong, X. L.; Huang, J.; Kang, Y. J.; Pan, G. Q.;

- Dai, F. Y.; Xiao, B. Multi-bioresponsive silk fibroin-based nanoparticles with on-demand cytoplasmic drug release capacity for CD44-targeted alleviation of ulcerative colitis. *Biomaterials*, **2019**, 212, 39–54.
- 59 Wu, P. Y.; Liu, Q.; Li, R. T.; Wang, J.; Zhen, X.; Yue, G. F.; Wang, H. Y.; Cui, F. B.; Wu, F. L.; Yang, M.; Qian, X. P.; Yu, L. X.; Jiang, X. Q.; Liu, B. R. Facile preparation of paclitaxel loaded silk fibroin nanoparticles for enhanced antitumor efficacy by locoregional drug delivery. *ACS Appl. Mater. Interfaces*, **2013**, 5(23), 12638–12645.
- 60 Yu, Q. W.; Meng, Z. Y.; Liu, Y. C.; Li, Z. H.; Sun, X.; Zhao, Z. Photocuring hyaluronic acid/silk fibroin hydrogel containing curcumin loaded CHITOSAN nanoparticles for the treatment of MG-63 cells and ME3T3-E1 cells. *Polymers*, **2021**, 13(14), 2302.
- 61 Salehi, S.; Koeck, K.; Scheibel, T. Spider silk for tissue engineering applications. *Molecules*, **2020**, 25(3), 737.
- 62 Hofer, M.; Winter, G.; Myschik, J. Recombinant spider silk particles for controlled delivery of protein drugs. *Biomaterials*, **2012**, 33(5), 1554–1562.
- 63 Ye, W. B.; Zhang, G. L.; Liu, X. M.; Ren, Q. D.; Huang, F. Q.; Yan, Y. F. Fabrication of polysaccharide-stabilized zein nanoparticles by flash nanoprecipitation for doxorubicin sustained release. *J. Drug Deliv. Sci. Technol.*, **2022**, 70, 103183.
- 64 Wang, Y.; Padua, G. W. Nanoscale characterization of zein self-assembly. *Langmuir*, **2012**, 28(5), 2429–2435.
- 65 Lei, Y. L.; Lee, Y. Nanoencapsulation and delivery of bioactive ingredients using zein nanocarriers: approaches, characterization, applications, and perspectives. *Food Sci. Biotechnol.*, **2024**, 33(5), 1037–1057.
- 66 Kakran, M.; Sahoo, N. G.; Li, L.; Judeh, Z. Fabrication of quercetin nanoparticles by anti-solvent precipitation method for enhanced dissolution. *Powder Technol.*, **2012**, 223, 59–64.
- 67 Joye, I. J.; McClements, D. J. Production of nanoparticles by anti-solvent precipitation for use in food systems. *Trends Food Sci. Technol.*, **2013**, 34(2), 109–123.
- 68 Yuan, Y. K.; Li, H.; Liu, C. Z.; Zhu, J. X.; Xu, Y.; Zhang, S. Z.; Fan, M. H.; Zhang, D. D.; Zhang, Y. N.; Zhang, Z. J.; Wang, D. F. Fabrication of stable zein nanoparticles by chondroitin sulfate deposition based on antisolvent precipitation method. *Int. J. Biol. Macromol.*, **2019**, 139, 30–39.
- 69 Yan, X. J.; Li, M. T.; Xu, X. F.; Liu, X. B.; Liu, F. G. Zein-based nano-delivery systems for encapsulation and protection of hydrophobic bioactives: a review. *Front. Nutr.*, **2022**, 9, 999373.
- 70 Zheng, H. M.; Wang, J. L.; You, F.; Zhou, M. Y.; Shi, S. W. Fabrication, characterization, and antimicrobial activity of carvacrol-loaded zein nanoparticles using the pH-driven method. *Int. J. Mol. Sci.*, **2022**, 23(16), 9227.
- 71 Yuan, Y. K.; Xiao, J. Z.; Zhang, P. Y.; Ma, M. J.; Wang, D. F.; Xu, Y. Development of pH-driven zein/tea saponin composite nanoparticles for encapsulation and oral delivery of curcumin. *Food Chem.*, **2021**, 364, 130401.
- 72 Drosou, C. G.; Krokida, M. K.; Biliaderis, C. G. Encapsulation of bioactive compounds through electrospinning/electrospraying and spray drying: a comparative assessment of food-related applications. *Dry. Technol.*, **2017**, 35(2), 139–162.
- 73 Yang, J.; Xie, J. H.; Paximada, E. Electrospayed zein and quercetin particles: formation and properties. *Food Bioprocess Technol.*, **2024**, Doi: 10.1007/s11947-024-03633-4.
- 74 de Souza Tavares, W.; Barreto, G. A. V.; Pinto, E. P.; de Barros Silva, P. G.; de Sousa, F. F. O. Influence of gelatin on the functional characteristics and wound healing potential of chitosan/zein films loaded with ellagic acid nanoparticles. *J. Drug Deliv. Sci. Technol.*, **2023**, 88, 104942.
- 75 Elsherbini, A. M.; Shalaby, T. I.; Abdelmonsif, D. A.; Rashed, S. A.; Haroun, M.; Sabra, S. A. Tadalafil-loaded zein nanoparticles incorporated into pectin/PVA nanofibers as a diabetic wound dressing with enhanced angiogenic and healing properties. *J. Drug Deliv. Sci. Technol.*, **2023**, 89, 105019.
- 76 Xu, H. L.; Jiang, Q. R.; Reddy, N.; Yang, Y. Q. Hollow nanoparticles from zein for potential medical applications. *J. Mater. Chem.*, **2011**, 21(45), 18227–18235.
- 77 Liu, Q. G.; Jing, Y. Q.; Han, C. P.; Zhang, H.; Tian, Y. M. Encapsulation of curcumin in zein/caseinate/sodium alginate nanoparticles with improved physicochemical and controlled release properties. *Food Hydrocoll.*, **2019**, 93, 432–442.
- 78 Dong, F. Y.; Dong, X. L.; Zhou, L. P.; Xiao, H. H.; Ho, P. Y.; Wong, M. S.; Wang, Y. Doxorubicin-loaded

- biodegradable self-assembly zein nanoparticle and its anti-cancer effect: preparation, *in vitro* evaluation, and cellular uptake. *Colloids Surf. B Biointerfaces*, **2016**, 140, 324–331.
- 79 Shinde, P.; Agraval, H.; Srivastav, A. K.; Yadav, U. C. S.; Kumar, U. Physico-chemical characterization of carvacrol loaded zein nanoparticles for enhanced anticancer activity and investigation of molecular interactions between them by molecular docking. *Int. J. Pharm.*, **2020**, 588, 119795.
- 80 Wang, D. D.; Tao, S. N.; Yin, S. W.; Sun, Y. J.; Li, Y. X. Facile preparation of zein nanoparticles with tunable surface hydrophobicity and excellent colloidal stability. *Colloids Surf. A Physicochem. Eng. Aspects*, **2020**, 591, 124554.
- 81 Tapia-Hernández, J. A.; Rodríguez-Felix, F.; Juárez-Onofre, J. E.; Ruiz-Cruz, S.; Robles-García, M. A.; Borboa-Flores, J.; Wong-Corral, F. J.; Cinco-Moroyoqui, F. J.; Castro-Enríquez, D. D.; Del-Toro-Sánchez, C. L. Zein-polysaccharide nanoparticles as matrices for antioxidant compounds: a strategy for prevention of chronic degenerative diseases. *Food Res. Int.*, **2018**, 111, 451–471.
- 82 Li, M.; Yu, M. H. Development of a nanoparticle delivery system based on zein/polysaccharide complexes. *J. Food Sci.*, **2020**, 85(12), 4108–4117.