

高良姜素 PEG-PLGA 纳米粒的制备及其缓解小鼠炎症性肺损伤作用

付悦^{1,2}, 郝鹏雁^{1,2}, 张馨月^{1,2}, 黄晓佳^{2*}

1. 常州大学 药学院、生物与食品工程学院, 江苏 常州 213164

2. 常州大学 医学与健康工程学院, 江苏 常州 213164

摘要: **目的** 制备载高良姜素 (Gal) 聚乙二醇-聚乳酸羟基乙酸共聚物 (PEG-PLGA) 纳米粒 (Gal-PEG-PLGA NPs), 研究其对脂多糖 (LPS) 诱导的小鼠炎症性肺损伤的治疗作用。 **方法** 采用乳化-溶剂挥发法将 Gal 包裹于纳米粒中, 单因素考察初步优化处方及制备工艺, 并进行表征。将 35 只 SPF 级小鼠随机分为对照组、模型组 (5 mg·kg⁻¹ LPS)、空白纳米粒组、游离型 Gal (8 mg·kg⁻¹) 组和 Gal-PEG-PLGA NPs 低、中、高剂量 (0.5、2、8 mg·kg⁻¹) 组, 每组 5 只。对照组给予相同体积 0.9% 氯化钠溶液, 其余动物 ip 5 mg·kg⁻¹ LPS, 1 h 后 ip 给药。24 h 后, 进行小鼠活体成像, 并取出肺组织进行苏木素-伊红 (HE) 染色观察肺组织病理变化; 通过检测肺组织中中性粒细胞髓过氧化物酶 (MPO) 活性, 评估中性粒细胞的组织浸润情况; 实时荧光定量 PCR (qRT-PCR) 法检测肺组织炎症因子 *Il-1b*、*Il-6*、*Tnf-α* mRNA 表达; 免疫印迹法检测 VE-cadherin、β-catenin 蛋白表达。 **结果** 单因素实验确定的最优处方为: PEG-PLGA 用量 60 mg, 有机相 Gal 用量 15 mg, 水相 PVA 质量浓度为 20 mg·mL⁻¹, 水相体积为 10 mL, 水相与有机相体积比 8:1。依据此处方制备的 Gal-PEG-PLGA NPs 呈圆球状, 粒径 (114.00±8.54) nm, 多分散指数为 0.166±0.010; ζ 电位为 (-10.67±2.08) mV。HE 染色结果表明, 与模型组相比, Gal-PEG-PLGA NPs 中、高剂量 (2、8 mg·kg⁻¹) 组, 非气管细胞数量显著降低 ($P<0.01$), 且呈现剂量相关性, 肺组织中 MPO 活性显著降低 ($P<0.01$), *Il-1b*、*Il-6*、*Tnf-α* mRNA 相对表达量显著降低 ($P<0.01$), VE-cadherin 和 β-catenin 蛋白表达水平显著提高 ($P<0.01$)。结果表明 2、8 mg·kg⁻¹ 的 Gal-PEG-PLGA NPs 能够有效抑制小鼠肺部炎症细胞浸润, 减少血管渗出, 降低炎症因子基因表达, 保护内皮细胞屏障。 **结论** Gal-PEG-PLGA NPs 可显著减轻小鼠炎症性肺损伤, 有望进一步开发为靶向治疗肺损伤的药物载体。

关键词: 纳米粒; 高良姜素; 炎症性肺损伤; 血管屏障; 细胞因子

中图分类号: R285.5

文献标志码: A

文章编号: 1674-6376(2025)07-1869-11

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2025.07.016

Preparation of galangin-loaded PEG-PLGA nanoparticles and effect on alleviating inflammatory lung injury in mice

FU Yue^{1,2}, HAO Pengyan^{1,2}, ZHANG Xinyue^{1,2}, HUANG Xiaojia¹

1. School of Pharmacy & School of Biological and Food Engineering, Changzhou University, Changzhou 213164, China

2. School of Medical & Health Engineer, Changzhou University, Changzhou 213164, China

Abstract: Objective To prepare galangin (Gal)-loaded polyethylene glycol-poly(lactic-co-glycolic acid) (PEG-PLGA) nanoparticles (Gal-PEG-PLGA NPs) and investigate the therapeutic effect on lipopolysaccharide (LPS)-induced inflammatory lung injury in mice. **Methods** Gal was encapsulated in nanoparticles by the emulsion-solvent evaporation method. The optimal formulation and preparation process were preliminarily optimized by single-factor experiments and characterized. Thirty-five SPF mice were randomly divided into the control group, model group (5 mg·kg⁻¹ LPS), blank nanoparticle group, free Gal (8 mg·kg⁻¹) group, and Gal-PEG-PLGA NPs low, medium, and high-dose (0.5, 2, 8 mg·kg⁻¹) groups, with five mice in each group. The control group was given the same volume of 0.9% sodium chloride solution, and the other animals were intraperitoneally injected with 5 mg·kg⁻¹ LPS. One hour later, they were intraperitoneally administered the drugs. After 24 hours, *in vivo* imaging of the mice was performed, and lung tissues were taken for hematoxylin-eosin (HE) staining to observe the pathological changes of the lung tissues. The infiltration

收稿日期: 2025-03-17

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81300059)

作者简介: 付悦, 女, 硕士研究生, 从事输送系统开发和药理学研究。E-mail: fuyue202406@163.com

*通信作者: 黄晓佳, 男, 博士, 副教授, 从事肺损伤的分子机制研究。E-mail: huangxj@cczu.edu.cn

of neutrophils in the tissues was evaluated by detecting the activity of neutrophil myeloperoxidase (MPO) in the lung tissues. The expression of inflammatory factors *Il-1b*, *Il-6*, and *Tnf- α* mRNA in the lung tissues was detected by real-time fluorescence quantitative PCR (qRT-PCR). The expression of VE-cadherin and β -catenin proteins was detected by Western blotting. **Results** The optimal formulation determined by single-factor experiments was as follows: PEG-PLGA dosage 60 mg, organic phase Gal dosage 15 mg, water phase PVA mass concentration 20 mg·mL⁻¹, water phase volume 10 mL, water phase to organic phase volume ratio 8 : 1. The Gal-PEG-PLGA NPs prepared according to this formulation were spherical, with a particle size of (114.00 ± 8.54) nm, a polydispersity index of 0.166 ± 0.010, and a ζ potential of (-10.67 ± 2.08) mV. The HE staining results showed that compared with the model group, the number of non-tracheal cells in the medium and high-dose (2, 8 mg·kg⁻¹) Gal-PEG-PLGA NPs groups was significantly reduced ($P < 0.01$), and there was a dose-dependent relationship. The MPO activity in the lung tissues was significantly reduced ($P < 0.01$), and the relative expression levels of *Il-1b*, *Il-6*, and *Tnf- α* mRNA were significantly decreased ($P < 0.01$). The expression levels of VE-cadherin and β -catenin proteins were significantly increased ($P < 0.01$). These results indicated that Gal-PEG-PLGA NPs with a concentration of 2, 8 mg·kg⁻¹ could effectively inhibit the infiltration of inflammatory cells in the lungs of mice, reduce vascular leakage, lower the expression of inflammatory factor genes, and protect the endothelial cell barrier. **Conclusion** Gal-PEG-PLGA NPs can significantly alleviate inflammatory lung injury in mice and are promising as a drug carrier for targeted treatment of lung injury.

Key words: nanoparticles; galangin; inflammatory pulmonary injury; vascular barrier; proinflammatory mediators

炎症性肺损伤是一类由肺炎、脓毒症、化学物质吸入等因素诱发的严重疾病，其对人类健康构成重大威胁。当病情恶化时，常进展为呼吸窘迫综合征，具有极高的致死率^[1-2]。正常生理状态下，肺血管内皮细胞层不仅是重要的物理屏障，能够维持血管功能稳态、预防血管内凝血并抑制液体渗出，还与肺泡上皮细胞共同构建气-血屏障，保障肺换气功能的正常实现^[3]。而在炎症性肺损伤发生时，肺血管内皮屏障遭到破坏，液体渗入肺泡腔，进而引发肺水肿、低氧血症等典型症状^[3-4]。由此可见，维持血管内皮屏障的完整性是治疗肺损伤、改善呼吸功能的关键策略之一。

高良姜素 (Gal) 是一种来自于高良姜根部的天然黄酮，现已被证实具有广泛的药理作用，可用于治疗神经退行性疾病、心血管疾病、肿瘤、糖尿病、肝脏损伤等^[5]。该化合物水溶性低，易溶于丙酮、四氢呋喃、乙腈等弱极性溶剂，体内吸收差^[6-7]，限制了其在临床上的广泛应用。纳米粒作为一种有效的药物输送载体，可提高化合物水溶性，促进细胞吸收，增加生物利用度^[8-10]。聚乳酸羟基乙酸共聚物 (PLGA) 是一种安全的生物材料，相容性好、体内可降解，已经在美国获得批准用于临床^[11]。聚乙二醇 (PEG) 是一种常用的高分子材料，可用于纳米材料的修饰，促进纳米粒在体内的分布，减少被吞噬细胞清除，提高药物输送效果^[12-13]。本研究构建一种负载 Gal 的 PEG 修饰 PLGA 纳米粒 (Gal-PEG-PLGANPs)，并探讨其对脂多糖 (LPS) 诱导小鼠炎

症性肺损伤的治疗作用，为 Gal 的进一步开发及应用提供参考。

1 仪器与材料

1.1 仪器

NanoZS 90 型纳米粒径电位分析仪，英国 Malvern Instruments 公司；JEM-2100V 型透射电镜，日本 JEOL 公司；HistoCore BIOCU 型石蜡切片机，德国 Leica 公司；Evolution 60S 型紫外-可见分光光度计，美国 Thermo 公司；JY92-IIDN 型超声波细胞破碎机，宁波新芝生物科技股份有限公司；Stepone plus 型实时荧光定量 PCR (qRT-PCR) 仪，美国 Thermo 公司；Mini-p4 型蛋白电泳仪，美国 Bio-rad 公司；Tanon 5200 型化学发光图像分析系统，上海天能生命科学有限公司。

1.2 药物和试剂

Gal (G100561, 批号 J2436527, 质量分数 > 98%)，上海阿拉丁生化科技股份有限公司；PEG-PLGA (相对分子质量 20 000, 批号 MKCV2408)，美国 Sigma 公司；聚乙烯醇 (PVA, 批号 J2225634)，上海阿拉丁生化科技股份有限公司；透析袋 (截留相对分子质量 7 000)，江苏麦格生物科技有限公司；总 RNA 抽提试剂 Trizol (批号 102489834)，美国 Sigma 公司；LPS (批号 SMB00704)，美国 Sigma 公司；cDNA 反转录试剂盒 (批号 3125183)，美国 Thermo 公司；荧光定量 PCR 试剂盒 (批号 2407542)，美国 Thermo 公司；VE-cadherin 抗体 (批号 00121943)、 β -catenin 抗体 (批号 23002541)，购自武汉三鹰生物技术有限公司； β -

actin 抗体 (批号 GR96779-9), 美国 Abcam 公司。其余试剂均为市售分析纯。

1.3 动物

8~12 周龄 SPF 级 C57BL/6 小鼠, 体质量 20~25 g, 购于常州卡文斯模式动物研究有限公司, 许可证号: SCXK (苏) 2021-0013。饲养于 SPF 动物房中, 给予标准实验动物饲料和自由饮水, 室温、湿度控制 20~25 °C 和 40%~70%。本研究严格遵守《江苏省实验动物管理办法》, 经过常州大学动物使用伦理委员会批准, 批准文号 XH-2024-03。

2 方法与结果

2.1 Gal-PEG-PLGA NPs 的制备

使用乳化-溶剂挥发法^[14]制备 Gal-PEG-PLGA NPs。依据文献方法^[14], PEG-PLGA 用量为 Gal-PEG-PLGA NPs 处方中关键因素, 因此固定 PEG-PLGA 用量为 60 mg, 将 PEG-PLGA 与 Gal 溶解于丙酮-乙醇 (4:1) 混合溶液中作为有机相, PVA 水溶液作为水相, 将有机相逐滴加入水相并不断搅拌, 冰浴条件下 100 W 超声 10 min (工作 20 s, 间隔 20 s) 得到乳化液。在通风橱内继续搅拌 18 h, 除去有机溶剂。室温下 5 000 r·min⁻¹ 离心 10 min, 上清液在 4 °C 以 15 000 r·min⁻¹ 离心 20 min, 沉淀即为 Gal-PEG-PLGA NPs, 双蒸水洗涤 2 次, 经 0.22 μm 微孔滤膜滤过后于 4 °C 保存。将制备得到的混悬液经 0.45 μm 滤膜滤过, 冷冻干燥 48 h, 得到 Gal-PEG-PLGA NPs 粉末。不添加 Gal 使用相同方式制备空白纳米粒粉末。

2.2 包封率、载药率、粒径、多分散指数 (PDI) 和 ζ 电位的测定

称取 2 mg Gal, 溶于 1 mL 二甲基亚砜 (DMSO) 中得到对照品母液, 以甲醇逐次稀释得到各质量浓度溶液 (1.25、2.50、5.00、10.00、20.00、40.00 μg·mL⁻¹)。用甲醇做空白对照, 测定对照品溶液 355 nm 处吸光度 (A) 值。以 Gal 质量浓度为横坐标, A 值为纵坐标, 绘制标准曲线。线性方程为: $Y=0.0936X+0.0225$, $R^2=0.9998$, 线性范围

1.25~40.00 μg·mL⁻¹。

采用透析法测定包封率^[14-15], 精密量取 Gal-PEG-PLGA NPs 混悬液 2 mL, 置于透析袋中, 扎紧透析袋两端, 放入盛有 50 mL 40%乙醇溶液的锥形瓶中, 37 °C 条件下以 1 000 r·min⁻¹ 速率振摇, 10 min 后吸取 2 mL 透析液, 在 355 nm 处测定 A 值。根据制备 2 mL Gal-PEG-PLGA NPs 混悬液所使用的 Gal 质量 ($M_{投药量}$) 和混悬液中总游离 Gal 质量 ($M_{游离}$), 计算包封率。

$$\text{包封率} = (M_{投药量} - M_{游离}) / M_{投药量}$$

取冻干后的 Gal-PEG-PLGA NPs, 称定质量得到 M, 加入丙酮-乙醇 (4:1) 使 Gal 完全释放, 测定被包封的 Gal 总质量 M_1 。计算 Gal-PEG-PLGA NPs 载药率。

$$\text{载药率} = M_1 / M$$

常温下, 用双蒸水 1:1 000 比例稀释纳米粒, 使用粒径分析仪检测纳米粒的粒径、PDI 和 ζ 电位。测定前, 各样品在室温下静置 5 min, 测定 3 次, 取平均值。

2.3 单因素考察

2.3.1 水相与有机相体积比考察 固定 Gal 用量为 10 mg, 水相 PVA 质量浓度为 10 mg·mL⁻¹, 水相 PVA 体积为 10 mL, 调整水相与有机相体积比在 6:1、8:1、10:1, 按“2.1”项下方法制备 Gal-PEG-PLGANPs, 以粒径、PDI、包封率和载药率为评价指标。结果如表 1 所示, 随着水相与有机相体积比逐渐增加, 颗粒粒径和 PDI 无显著变化, 包封率和载药量先增大后降低, 体积比为 8:1 时包封率和载药量最高。考虑到包封率和载药率的变化, 选择水相与有机相体积比为 8:1。

2.3.2 PVA 质量浓度考察 固定有机相 Gal 质量为 10 mg, 水相与有机相体积比为 8:1, 水相 PVA 体积为 10 mL, 调整水相 PVA 质量浓度为 10、15、20、25、30 mg·mL⁻¹, 按“2.1”项下方法制备 Gal-PEG-PLGA NPs, 按照“2.2”项下方法测得粒径、PDI、包封率和载药率。结果如表 2 所示, 随着 PVA 质

表 1 水相与有机相体积比考察 ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Table 1 Investigation of volume ratio of aqueous phase to organic phase ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

水相与有机相体积比	粒径/nm	PDI	包封率/%	载药率/%
6:1	127.00±8.72	0.33±0.03	72.56±1.16	7.22±0.14
8:1	121.00±2.65	0.30±0.03	87.52±1.07	8.93±0.25
10:1	126.33±0.58	0.32±0.02	81.56±1.04	7.86±0.10

表 2 PVA 质量浓度考察 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 2 Investigation on concentration of PVA ($\bar{x} \pm s, n=3$)

PVA 质量浓度/(mg·mL ⁻¹)	粒径/nm	PDI	包封率/%	载药率/%
10	121.00±2.65	0.30±0.03	87.52±1.07	8.93±0.25
15	120.67±1.53	0.22±0.01	91.33±1.01	9.14±0.14
20	119.67±3.06	0.19±0.01	95.77±2.06	9.54±0.06
25	124.67±5.13	0.20±0.03	89.30±1.01	9.05±0.14
30	135.00±5.29	0.32±0.03	81.97±0.40	7.92±0.27

量浓度不断增加, 粒径和 PDI 均表现出先减小后增加的趋势, 包封率和载药率表现出先增加后减小的趋势。考虑到包封率和载药率的变化, 选择 PVA 质量浓度为 20 mg·mL⁻¹。

2.3.3 Gal 用量考察 固定水相与有机相体积比为 8:1, 水相 PVA 质量浓度为 20 mg·mL⁻¹, 水相 PVA 体积为 10 mL, 调整 Gal 用量为 5、10、15、

20、25 mg, 按“2.1”项下方法制备 Gal-PEG-PLGA NPs, 按照“2.2”项下方法测得粒径、PDI、包封率和载药率。结果如表 3 所示, 随着有机相 Gal 用量不断增加, 颗粒粒径表现出先减小后增加趋势, PDI 表现出先减小后增加趋势, 包封率和载药率表现出先增加后减小趋势。综合考虑包封率和载药率因素, 选择 Gal 用量为 15 mg。

表 3 Gal 用量考察 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 3 Investigation on dosage of Gal ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Gal 用量/mg	粒径/nm	PDI	包封率/%	载药率/%
5	122.00±4.36	0.18±0.01	83.73±1.87	8.06±0.20
10	123.33±3.06	0.21±0.01	95.77±2.06	9.54±0.06
15	114.00±8.54	0.17±0.01	96.12±2.15	9.61±0.10
20	133.67±4.73	0.20±0.01	84.90±2.42	8.26±0.12
25	146.7±6.80	0.28±0.03	76.27±2.76	7.65±0.22

综合以上结果, 最终处方条件为, PEG-PLGA 用量 60 mg, 有机相 Gal 用量 15 mg, 水相与有机相体积比 8:1, 水相体积为 10 mL, 水相 PVA 质量浓度为 20 mg·mL⁻¹。

2.4 Gal-PEG-PLGA NPs 的表征

将制备得到的 Gal-PEG-PLGA NPs 用双蒸水稀释 100 倍, 混匀取适量滴加于铜网上, 以磷钨酸钠染色后风干, 采用透射电子显微镜 (TEM) 放大

200 000 倍观察表面形态和结构。结果如图 1-A 所示, Gal-PEG-PLGA NPs 均表现为球形外观, 形态圆整规则。如图 1-B、C 所示, 纳米粒的平均粒径为 (114.00±8.54) nm, PDI 为 0.166±0.010; ζ 电位为 (-10.67±2.08) mV。

2.5 小鼠肺组织蓄积考察

采用荧光染料香豆素-6 (C6) 包载于空白纳米粒中, 制备成 C6-PEG-PLGA NPs。小鼠 ip 5 mg·kg⁻¹

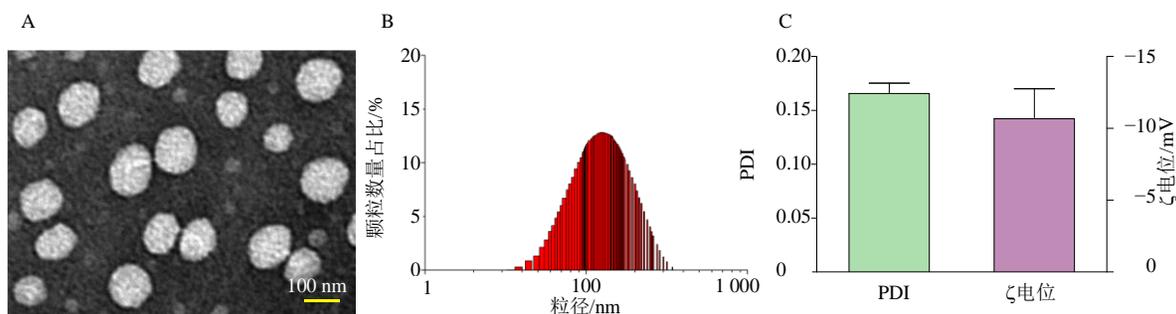


图 1 Gal-PEG-PLGA NPs 的透射电镜图 (A)、粒径 (B) 及 ζ 电位 (C) ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Fig. 1 TEM image (A), particle size (B) and ζ potential (C) of Gal-PEG-PLGA NPs ($\bar{x} \pm s, n=3$)

LPS, 1 h 后 ip 游离 C6 或 C6-PEG-PLGA NPs (C6 剂量均为 $10 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$)。于 LPS 给药后 6、12、24 h, 应用小动物活体成像系统, 在 535 nm 下检测小鼠体内荧光强度, 选择胸骨柄游离端水平面作为胸腔腹腔分界线, 统计胸腔部位荧光强度。并在 24 h 后收集小鼠各脏器, 在成像系统下进行荧光成像, 评

估小鼠体内纳米粒的组织分布。结果如图 2-A 所示, 与游离 C6 组相比, C6-PEG-PLGA NPs 组胸腔部位平均荧光强度明显高于游离 C6 组 ($P<0.01$)。如图 2B 所示, C6 注射 24 h 时, 游离 C6 组小鼠肺脏、肝脏组织中几乎没有荧光信号, 而 C6-PEG-PLGA NPs 组小鼠肺脏、肝脏荧光信号较强 ($P<0.01$)。其余

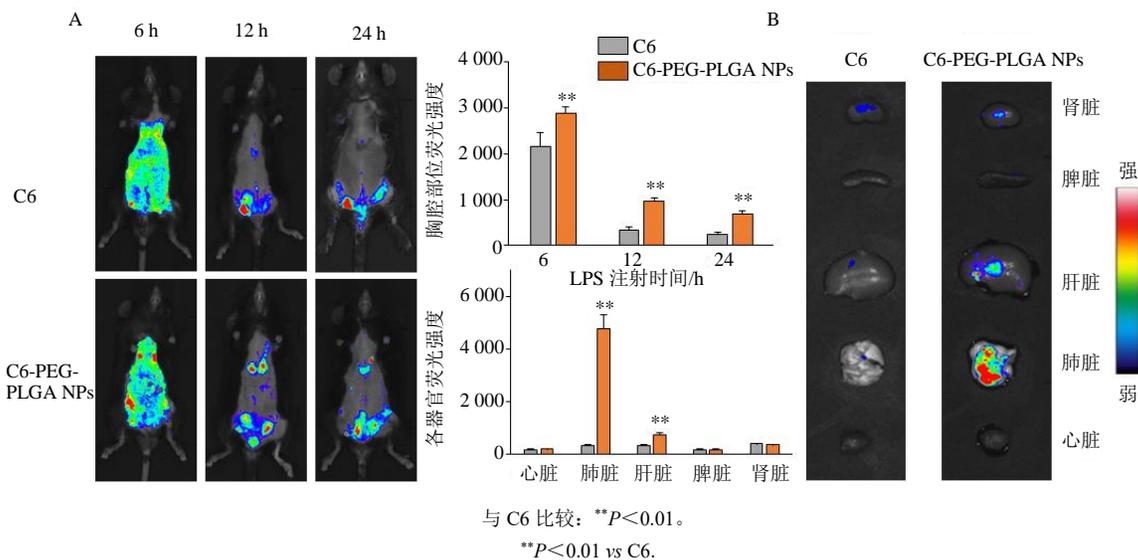


图 2 模型小鼠 ip C6 或 C6-PEG-PLGA NPs 后不同时间 (A) 及注射 24 h 后不同脏器 (B) 荧光成像 ($\bar{x} \pm s, n=4$)

Fig. 2 Fluorescent visualization of model mice after injection of C6 or C6-PEG-PLGA NPs at different times (A) and in different organs 24 hours after injection (B) ($\bar{x} \pm s, n=4$)

器官包括心脏、脾脏、肾脏等中荧光信号未见显著性差别, 表明 PEG-PLGANPs 具有一定的肺组织滞留效应, 可促进药物在肺部聚集。

2.6 Gal-PEG-PLGA NPs 体内药效评价

2.6.1 造模及给药 SPF 小鼠 35 只, 适应性喂养 1 周后, 随机分为对照组 (0.9%氯化钠溶液)、模型组 ($5 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ LPS)、空白纳米粒组 (LPS+空白纳米粒)、游离 Gal 组 (LPS+Gal) 和 Gal-PEG-PLGA NPs 低、中、高剂量组 [LPS+Gal-PEG-PLGA NPs (0.5 、 2.0 、 $8.0 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$)], 每组 5 只。除对照组之外, 其余各组小鼠均接受 ip LPS ($5 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) 诱发炎症性肺损伤^[16], 并于造模 1 h 后 ip 给药。为验证纳米粒的作用, 依据文献和预试验验证选用无效剂量 $8 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 作为游离型 Gal 的注射剂量^[17-18], 并于 LPS ip 24 h 后, 收集小鼠肺组织进行后续实验。

2.6.2 小鼠肺组织苏木素-伊红 (HE) 染色 肺组织经福尔马林固定、脱水、石蜡包埋后, 用切片将组织切成 $5 \mu\text{m}$ 切片, 进行 HE 染色, 于光学显微镜下观察并拍照。结果如图 3-A、B 所示, 与对照组相比, 模型组肺组织中非气管细胞数量显著

增加 ($P<0.01$); 与模型组相比, Gal-PEG-PLGA NPs 中、高剂量组非气管细胞数量显著降低 ($P<0.01$), 且呈现剂量相关性, 而空白纳米粒和游离 Gal 均未表现出明显抑制作用。表明 PEG-PLGA NPs 显著增强了 Gal 的体内生物利用度, Gal 到达肺部缓解肺血管损伤, 抑制血液中的炎症细胞向肺组织浸润。

2.6.3 中性粒细胞髓过氧化物酶 (MPO) 活性 肺血管通透性增加时, 炎症细胞如中性粒细胞、巨噬细胞从血管内皮细胞间隙中游走并趋化至肺组织, 造成组织中细胞浸润。可通过检测 MPO 活性, 评估中性粒细胞的组织浸润情况^[16,19]。将肺组织置于 pH 值为 6.0 的磷酸盐缓冲液中匀浆, 匀浆液于 $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 下以 $15\,000 \text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 10 min, 弃上清。将沉淀悬浮于 0.5% 十六烷基三甲基溴化铵溶液中, 经 $-20 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 冷冻 2 h, 室温融化后再次匀浆。在 $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 下以 $15\,000 \text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 10 min, 收集上清作为测试液。将测试液与 H_2O_2 (质量浓度 $7.4 \times 10^{-6} \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) 和邻联茴香胺 (质量浓度 $0.16 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) 混合, 在 460 nm 下测量 A 值, 每 15 秒测量 1 次, 连续测量

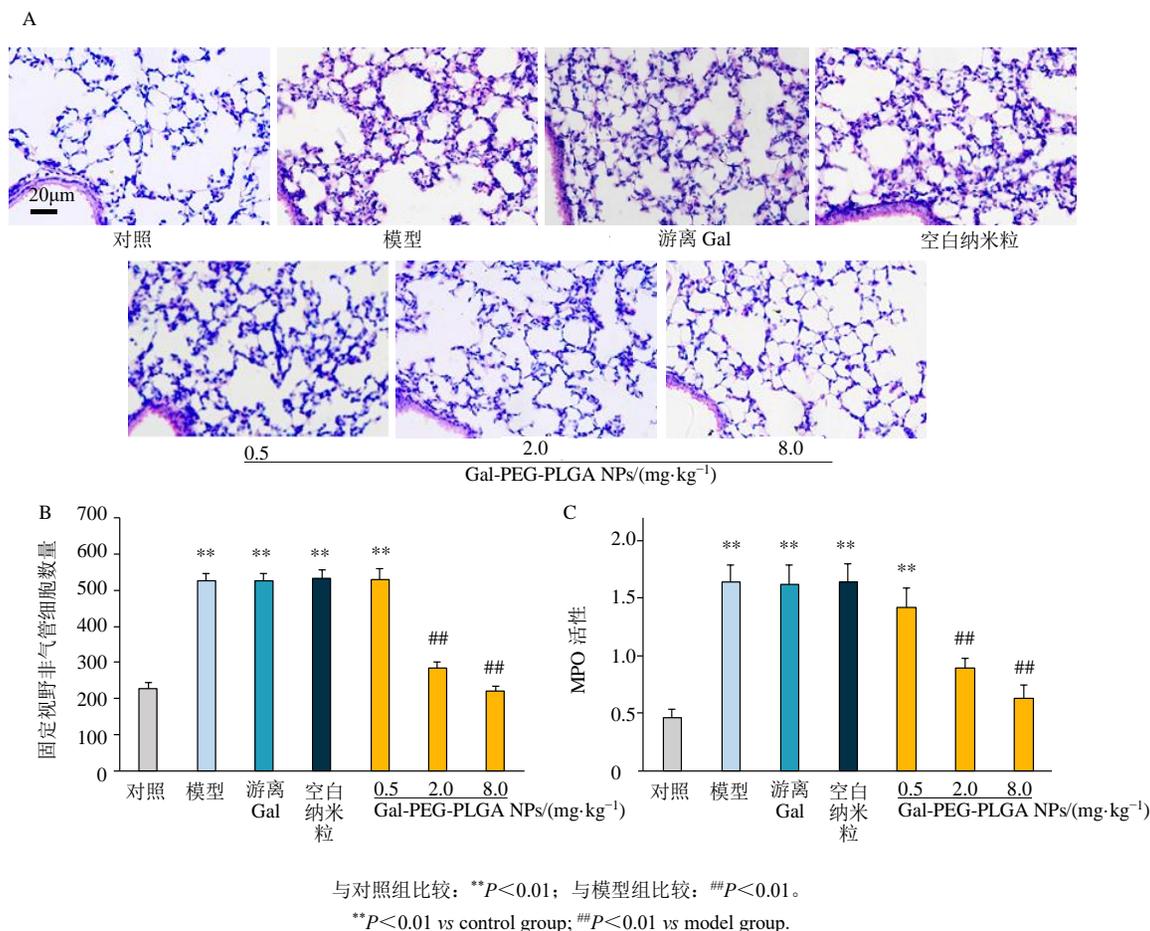


图 3 小鼠肺组织 HE 染色 (A)、同一视野下非气管细胞数量 (B) 及 MPO 活性 (C) ($\bar{x} \pm s, n=4$)

Fig. 3 HE staining of mouse lung tissue (A), the number of non-tracheal cells in the same field (B), and MPO activity (C) ($\bar{x} \pm s, n=4$)

3 min, 在分光光度计上直接读取 3 min 内 A 值变化斜率, 计算 MPO 活性, 评估中性粒细胞数量变化^[20]。

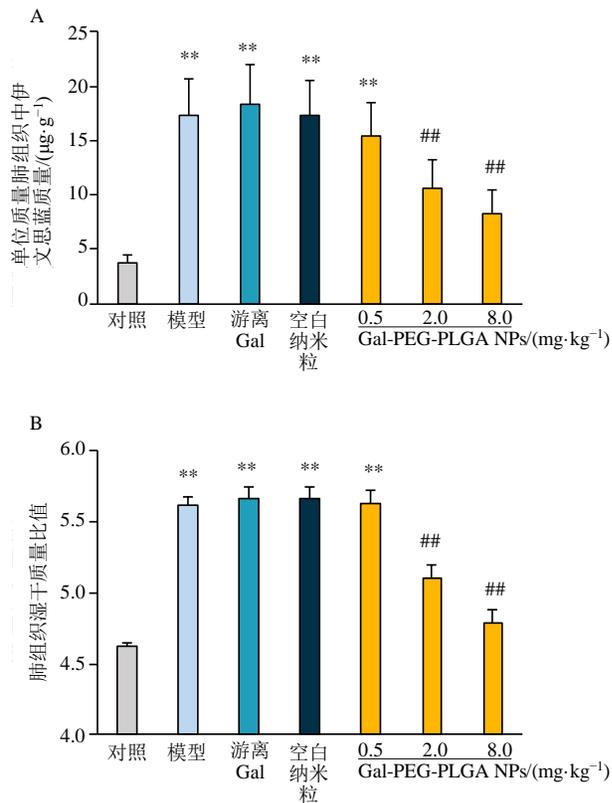
MPO 活性 = A 值变化斜率 / 肺组织质量

如图 3-C 所示, 与对照组相比, 模型组小鼠肺组织 MPO 活性显著增加 ($P < 0.01$); Gal-PEG-PLGA NPs 中、高剂量组肺组织中 MPO 活性显著降低 ($P < 0.01$)。空白纳米粒组和游离 Gal 组均未表现出任何作用, 表明 PEG-PLGA NPs 可显著促进 Gal 体内吸收, 提高其在血液中的浓度, 通过保护肺血管损伤而抑制中性粒细胞进入肺组织。

2.6.4 小鼠肺血管渗出、组织水肿考察 炎症性肺血管损伤发生时, 肺组织血管内皮细胞-上皮细胞屏障被破坏, 血管渗透性增加。病理学表现为肺实质炎症细胞大量浸润, 血管渗出增加进而发生肺水肿, 严重时可导致死亡。可通过检测小鼠 iv 白蛋白结合的伊文思蓝染料后肺组织中渗出染料含量变化, 评估血液中蛋白质由肺血管渗出情况^[20]。

配制质量浓度分别为为 1.25、2.50、5.00、10.00、15.00、20.00 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的白蛋白结合的伊文思蓝溶液, 在 620 nm 处测量 A , 绘制标准曲线。线性方程为 $Y=0.0216X+0.0091$, $R^2=0.9958$, 线性范围 1.25~20 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

35 只 SPF 级小鼠, 分组、造模及给药方法同“2.6.1”项, 给药后 iv 白蛋白结合的伊文思蓝染料 (20 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$), 30 min 后收集肺组织, 称质量 ($M_{\text{肺组织}}$), 以磷酸盐缓冲液 (PBS, pH 7.4) 匀浆并与等体积甲酰胺混合, 于 60 °C 下静置 10 h, 室温下以 15 000 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 20 min, 上清液在 620 nm 处测 A 值, 以标准曲线法, 计算肺组织中伊文思蓝质量 ($M_{\text{伊文思蓝}}$), 根据单位质量肺组织中伊文思蓝质量评估肺血管渗出程度^[20]。如图 4-A 所示, 与对照组相比, 模型组小鼠肺血管渗出显著增加 ($P < 0.01$); 与模型组相比, Gal-PEG-PLGA NPs 中、高剂量组小鼠肺血管渗出显著降低 ($P < 0.01$), 空白



与对照组比较: ** $P < 0.01$; 与模型组比较: ## $P < 0.01$ 。

** $P < 0.01$ vs control group; ## $P < 0.01$ vs model group.

图 4 单位质量肺组织中伊文思蓝质量 (A) 与肺组织湿干质量比 (B) ($\bar{x} \pm s$, $n=5$)

Fig. 4 Mass of Evans blue per unit mass of lung tissue (A) and the ratio of wet to dry mass of the lung tissue ($\bar{x} \pm s$, $n=5$)

纳米粒和游离 Gal 未表现出任何作用。这些结果表明, LPS 可诱导肺血管损伤, 引起血液中蛋白质成分渗出, PEG-PLGA NPs 可将 Gal 递送至肺组织, 缓解肺血管损伤, 降低蛋白质渗出。

单位质量肺组织中伊文思蓝质量 = $M_{\text{伊文思蓝}} / M_{\text{肺组织}}$

肺血管渗出可导致肺组织含水量增加, 可采用肺组织湿质量与干质量比值法检测肺血管渗出程度^[19-20]。称得肺组织湿质量, 于 60 °C 烘烤 3 d 后称质量, 计算湿质量与干质量比。如图 4-B 所示, 与对照组相比, 模型组小鼠肺湿质量与干质量比显著增加 ($P < 0.01$); 与模型组相比, Gal-PEG-PLGA NPs 中、高剂量组小鼠肺湿、干质量比显著降低 ($P < 0.01$), 表明 LPS 可诱导肺血管损伤, 引起液体成分从血管中渗出至肺组织间质, Gal-PEG-PLGA NPs 可显著改善水分渗出, 降低肺组织含水量, 发挥血管保护作用。

2.7 小鼠存活率考察

取 40 只小鼠, 不设置空白纳米粒组, 其余分组、造模及给药与“2.6.1”项相同, 给药后 1 h, ip 致死剂量 LPS ($12 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$), 观察 96 h 内小鼠存活率, 评估 Gal-PEG-PLGA NPs 对小鼠的保护作用。如图 5 所示, 与模型组相比, Gal-PEG-PLGA NPs 中、高剂量组可显著提高小鼠存活率 ($P < 0.01$)。

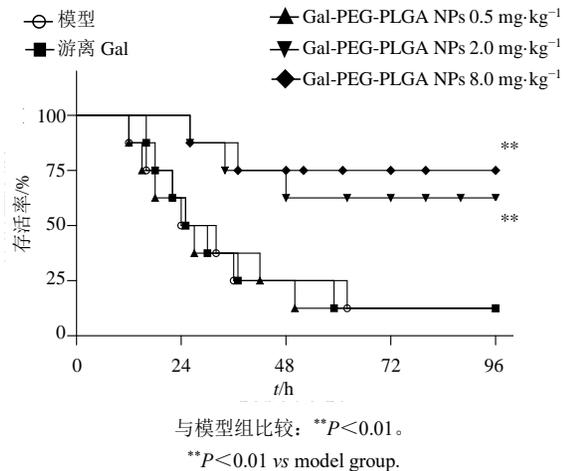


图 5 Gal-PEG-PLGA NPs 提高 ip 致死剂量 LPS 小鼠的存活率 ($n=8$)

Fig. 5 Gal-PEG-PLGA NPs increase survival rate of mice with lethal dose of LPS induced by ip injection ($n=8$)

2.8 Gal-PEG-PLGA NPs 作用机制研究

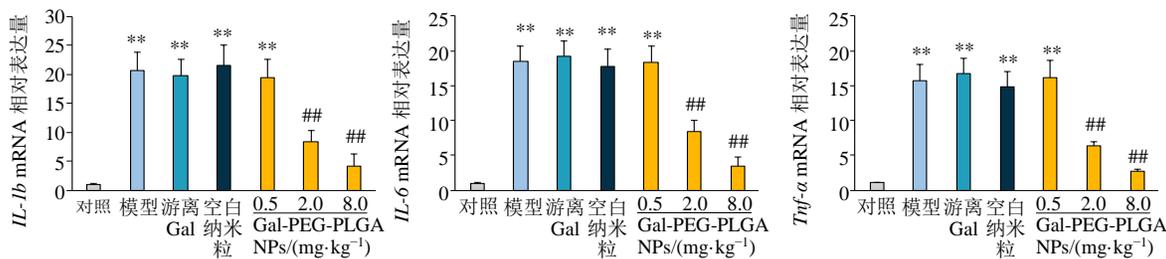
2.8.1 qRT-PCR 检测 *Il-1b*、*Il-6*、*Tnf-α* mRNA 表达取“2.6.1”项下小鼠新鲜肺组织, 依据文献方法提取总 RNA^[20]。取 1 μg 总 RNA 进行反转录合成 cDNA 模板, 以甘油醛-3-磷酸脱氢酶 (*Gapdh*) 为内参基因, 以 2^{-ΔΔCt} 法计算各指标 mRNA 相对表达量。引物序列见表 4。

表 4 引物序列

Table 4 Primer sequences

基因	引物序列 (5'→3')
<i>Il-1b</i>	上游: GCAGGCAGTATCACTCATTGTGG
	下游: GAGTCACAGAGGATGGGCTCTTC
<i>Il-6</i>	上游: GAGGAGACTTCACAGAGGATACCAC
	下游: TTGCCATTGCACAACCTCTTTTC
<i>Tnf-α</i>	上游: TGACAAGCCTGTAGCCACG
	下游: TTGTCTTTGAGATCCATGCCG
<i>Gapdh</i>	上游: TCTTGTGCAGTGCCAGCCT
	下游: TGAGGTCAATGAAGGGGTCCG

肺血管发生损伤后, 炎症细胞进入肺组织, 合成并释放炎症因子, 造成血管通透性增加。qRT-PCR 实验结果如图 6 所示, 与对照组相比, 模型



与对照组比较: ** $P < 0.01$; 与模型组比较: ## $P < 0.01$ 。

** $P < 0.01$ vs control group; ## $P < 0.01$ vs model group.

图 6 Gal-PEG-PLGA NPs 抑制炎症因子 *IL-1b*、*IL-6*、*Tnf-α* mRNA 表达 ($\bar{x} \pm s$, $n=4$)

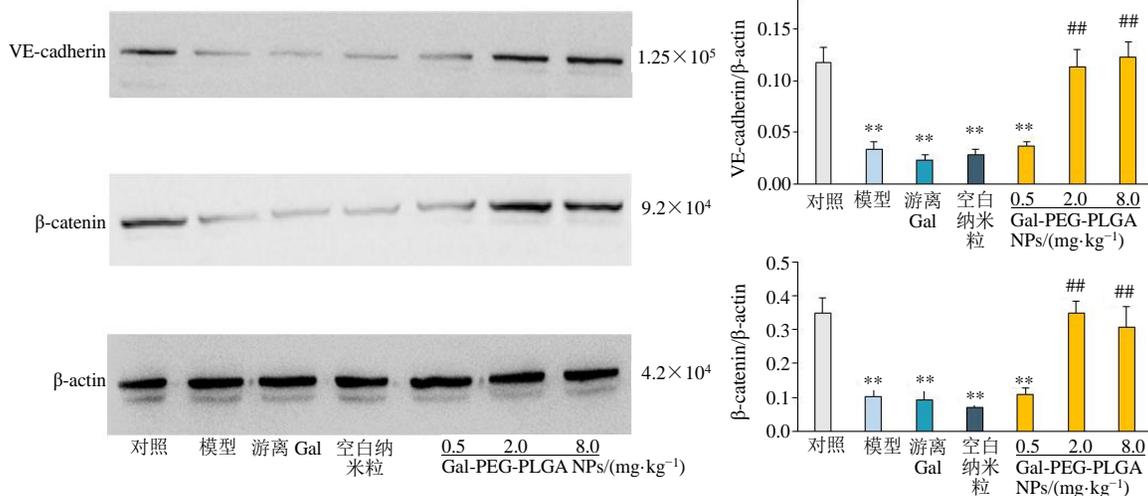
Fig. 6 Galangin-loaded nanoparticles decreases the mRNA levels of pro-inflammatory mediators ($\bar{x} \pm s$, $n=4$)

组小鼠肺组织炎症因子 *IL-1b*、*IL-6*、*Tnf-α* 的 mRNA 相对表达量均显著升高 ($P < 0.01$), 与模型组相比, Gal-PEG-PLGA NPs 中、高剂量组各炎症因子 mRNA 相对表达量显著降低 ($P < 0.01$), 空白纳米粒和游离 Gal 均未表现出抑制作用, 表明 Gal-PLGA NPs 可显著抑制肺组织中炎症因子的产生, 抑制炎症反应。

2.8.2 蛋白质免疫印迹法检测小鼠肺组织中 VE-cadherin、β-catenin 的表达 肺血管屏障由肺血管内皮细胞的黏合连接所控制, 该连接由细胞间蛋白如血管钙黏蛋白 (VE-cadherin) 和 β-连环蛋白 (β-catenin) 等组成, VE-cadherin 和 β-catenin 蛋白表达降低则表明内皮细胞屏障出现破损, 通透性增加^[16]。采用蛋白质免疫印迹检测相关蛋白表达水平, 可判断肺血管损伤情况。

将适量裂解液加入“2.6.1”项下肺组织中并进行组织匀浆, 离心后得到蛋白提取液。测定蛋白浓度后进行蛋白质免疫印迹实验。取 20 μg 样品进行 SDS-PAGE 凝胶电泳, 之后将转印膜置于 5% 脱脂奶粉溶液中, 室温条件下封闭 1h, 继而与一抗 β-肌动蛋白 (β-actin) 抗体 (1 : 20 000)、抗 VE-cadherin 蛋白抗体 (1 : 6 000)、抗 β-catenin 蛋白抗体 (1 : 10 000), 在 4 °C 条件下, 以 60 r·min⁻¹ 反应 14 h。室温下, 将转印膜与辣根过氧化物酶结合的二抗 (1 : 12 000) 反应 1 h, 使用化学发光液反应, 并用凝胶成像系统扫描。采用 Image J 软件测定蛋白条带灰度值, 计算蛋白相对表达量。

如图 7 所示, 与对照组相比, 模型组小鼠肺组织 VE-cadherin 和 β-catenin 蛋白表达水平显著降低 ($P < 0.01$); Gal-PEG-PLGA NPs 中、高剂量组 VE-



与对照组比较: ** $P < 0.01$; 与模型组比较: ## $P < 0.01$ 。

** $P < 0.01$ vs control group; ## $P < 0.01$ vs model group.

图 7 Gal-PEG-PLGA NPs 对 LPS 诱导小鼠肺损伤中肺组织 VE-cadherin 和 β-catenin 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Fig. 7 Effect of Gal-PEG-PLGA NPs on expression of VE-cadherin and β-catenin proteins in lung tissue during LPS-induced lung injury in mice ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

cadherin 和 β -catenin 蛋白表达水平显著提高 ($P < 0.01$), 表明 Gal-PEG-PLGA NPs 可通过稳定肺血管内皮细胞的黏合连接, 维持血管屏障, 发挥血管保护作用。空白纳米粒和游离 Gal 没有任何作用。

2.9 统计学分析

实验结果计量资料均以 $\bar{x} \pm s$ 形式表示, 并采用统计软件 SPSS 22.0 进行单因素方差分析, 组间差异通过 LSD- t 进行检验, $P < 0.05$ 时认为两组间数据有显著性差异。

3 讨论

本研究制备了 Gal-PEG-PLGA NPs, 并评价其对小鼠炎症性肺血管损伤的效果。结果表明, LPS 诱导小鼠炎症性肺损伤模型中, Gal-PEG-PLGA NPs 可减轻血管屏障损伤, 缓解血管渗出和肺水肿, 降低炎症细胞浸润和促炎因子表达, 提高小鼠存活率, 而游离型 Gal 和空白纳米粒没有保护作用, 提示 PEG-PLGA NPs 具有良好的药物输送作用, 显著提高了 Gal 体内生物利用度, 发挥了保护作用。

多项研究已证实, Gal 展现出显著的心脑血管保护效应。其作用具体表现为: 能增加局部脑血管血流量, 对神经细胞线粒体起到保护作用, 减轻心肌细胞纤维化程度, 还可缓解儿茶酚胺类物质诱导的大鼠心肌肥大与纤维化问题, 同时改善主动脉功能失调及血管重构情况^[21-24]。从作用机制来看, Gal 可直接结合血红素氧合酶-1, 进而恢复抗氧化/氧化系统的平衡状态, 抑制细胞铁死亡进程, 促进细胞能量代谢, 并且能抑制血管内皮细胞中炎症信号的激活^[22-27]。

然而, Gal 存在明显局限性: 其水溶性和生物利用度较差, 会对肝脏药物代谢酶的功能产生影响, 因此不适宜重复给药, 且容易发生药物相互作用, 这些因素导致其应用受到限制^[7]。值得注意的是, 通过 PEG 进行表面修饰后, PLGA 纳米粒的表面亲水性和稳定性得到进一步提升, 不仅能增强药物在体内的吸收效果, 还可促使药物聚集于病变部位, 从而发挥缓释作用^[12]。在药物剂量方面, 游离型 Gal 的常用有效剂量为 $25 \sim 50 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ ^[17-18]。而本研究中 Gal-PEG-PLGA NPs 的中、高剂量能够显著保护小鼠肺血管损伤, 这一结果充分表明纳米粒剂型有效促进了 Gal 在体内的吸收。

本研究证实, Gal-PEG-PLGA NPs 可通过抑制小鼠肺组织炎症细胞浸润并下调 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 等促炎细胞因子的基因表达, 显著改善炎症性肺

损伤。从脓毒症病理机制分析, 免疫系统过度激活所引发的细胞因子风暴^[2], 是驱动炎症级联反应的核心环节。该病理过程通过诱导炎症性细胞死亡(包括细胞焦亡、坏死性凋亡及泛凋亡等形式), 破坏肺部气血屏障并最终导致多器官功能衰竭。

炎症性细胞死亡的分子机制涉及炎症小体激活、RIPK3 信号通路活化及泛凋亡小体形成等多重途径, 进而引发巨噬细胞、肺血管内皮细胞及肺泡上皮细胞的程序性死亡^[28]。在新型冠状病毒肺炎(COVID-19)相关脓毒症中, TNF- α 与 IFN- γ 通过上述机制诱发炎症性细胞死亡及多器官功能障碍, 而靶向中和抗体已被证实可有效阻断该病理进程^[28-29]。此外, 细胞因子风暴还可通过激活中性粒细胞等吞噬细胞, 诱导氧自由基爆发性释放, 导致细胞内生物大分子过氧化损伤与线粒体功能衰竭, 形成炎症-氧化应激的恶性循环^[30]。综上, 脓毒症肺损伤的病理基础在于细胞因子级联反应与炎症性细胞死亡的过度激活。本研究结果提示, 通过干预细胞因子网络抑制炎症信号传导, 可作为缓解肺组织炎性损伤、改善肺通气功能的潜在治疗策略。该发现为脓毒症相关肺损伤的临床干预提供了新的理论依据。

肺血管内皮细胞屏障在调节肺血管通透性、维持血管稳态及调控免疫反应等方面发挥关键作用, 是保障肺部正常生理功能的重要结构基础。现有研究表明, 细菌性感染或 LPS 刺激可显著激活肺血管内皮细胞内 NF- κ B 等信号通路, 引发内皮细胞功能紊乱与表型转化, 进而导致炎症细胞趋化浸润、中性粒细胞过度激活、血管内凝血级联反应及黏附分子异常表达等病理过程^[31]。上述改变最终造成血管屏障完整性破坏, 加剧肺组织炎性损伤。因此, 维持肺血管内皮细胞连接稳定性、保护内皮屏障功能, 已成为脓毒症相关性肺损伤治疗的重要策略。肺血管内皮细胞黏附连接的动态平衡受 VE-cadherin、 β -catenin 等多种关键蛋白协同调控。这些蛋白通过与细胞骨架蛋白相互作用, 构建稳定的细胞间连接结构, 其表达水平、磷酸化修饰及泛素化状态直接影响血管屏障功能。研究证实, 上调 VE-cadherin、 β -catenin 等蛋白表达, 可有效降低肺血管屏障通透性, 减轻组织水肿及炎症渗出^[32-33]。本研究发现, LPS 暴露可显著下调小鼠肺组织中 VE-cadherin 与 β -catenin 蛋白表达水平; 与之形成鲜明对比的是, Gal-PEG-PLGA NPs 能够剂量相关性地

上调上述蛋白表达,而同等剂量的游离型 Gal 则未呈现类似效应。该结果表明, Gal-PEG-PLGANPs 可通过稳定内皮细胞黏附连接,有效减轻血管屏障损伤。值得注意的是,这一作用机制不同于 Gal 已知的抗氧化应激、抗细胞死亡及线粒体保护功能,提示其在脓毒症治疗中具有独特的作用优势,为炎症性疾病治疗提供了新的干预靶点。

需指出的是,炎症性肺血管损伤是多因素协同作用的病理过程,涉及组织感染、炎症细胞功能亢进及多种细胞间相互作用。本研究聚焦于 Gal-PEG-PLGA NPs 对肺血管内皮屏障的保护效应,尚未系统探讨其对炎症细胞、肺泡上皮细胞等其他相关细胞的调控作用。后续研究拟从多细胞层面深入解析 Gal-PEG-PLGA NPs 的作用机制,进一步明确其在肺组织损伤修复中的分子靶点与信号通路。

综上所述,本研究表明, Gal-PEG-PLGANPs 可缓解小鼠炎症性肺损伤,其作用与减轻炎症细胞浸润、抑制细胞因子分泌、维持肺血管内皮连接有关。PEG-PLGA 修饰提高了 Gal 的水溶性和生物利用度,延长其在肺部的停留时间,使其直接作用于肺组织病灶,为 Gal 的纳米靶向制剂开发提供了理论基础。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

[1] Bos L D J, Ware L B. Acute respiratory distress syndrome: Causes, pathophysiology, and phenotypes [J]. *Lancet*, 2022, 400(10358): 1145-1156.

[2] Swenson K E, Swenson E R. Pathophysiology of acute respiratory distress syndrome and COVID-19 lung injury [J]. *Crit Care Clin*, 2021, 37(4): 749-776.

[3] Meyer N J, Gattinoni L, Calfee C S. Acute respiratory distress syndrome [J]. *Lancet*, 2021, 398(10300): 622-637.

[4] Borek I, Birnhuber A, Voelkel N F, et al. The vascular perspective on acute and chronic lung disease [J]. *J Clin Invest*, 2023, 133(16): e170502.

[5] Devadoss D, Ramar M, Chinnasamy A. Galangin, a dietary flavonol inhibits tumor initiation during experimental pulmonary tumorigenesis by modulating xenobiotic enzymes and antioxidant status [J]. *Arch Pharm Res*, 2018, 41(3): 265-275.

[6] Hassanein E H M, Abd El-Maksoud M S, Ibrahim I M, et al. The molecular mechanisms underlying anti-inflammatory effects of galangin in different diseases [J]. *Phytother Res*, 2023, 37(7): 3161-3181.

[7] Ma Y L, Zhao F, Yin J T, et al. Two approaches for

evaluating the effects of galangin on the activities and mRNA expression of seven CYP450 [J]. *Molecules*, 2019, 24(6): 1171.

[8] 张惜琴, 范媛媛, 梁靓靓, 等. 姜黄素纳米制剂抗消化系统肿瘤的药理作用研究进展 [J]. *药物评价研究*, 2022, 45(7): 1440-1445.

Zhang X Q, Fan Y Y, Liang J J, et al. Pharmacological progress of curcumin nanoparticles against tumor of digestive system [J]. *Drug Eval Res*, 2022, 45(7): 1440-1445.

[9] 高聆毓, 贾瑞欣, 毕野, 等. 丹参酮II_A 聚合物脂质纳米粒制备及脑部药物递送研究 [J]. *药物评价研究*, 2022, 45(5): 909-917.

Gao L Y, Jia R X, Bi Y, et al. Study on preparation of tanshinone II_A polymer lipid nanoparticles and brain delivery [J]. *Drug Eval Res*, 2022, 45(5): 909-917.

[10] 周敬, 郑宝玉, 李阳杰, 等. 聚乙二醇修饰高良姜素纳米结构脂质载体处方优化及口服药动学评价 [J]. *中草药*, 2023, 54(14): 4455-4466.

Zhou J, Zheng B Y, Li Y J, et al. Formulation optimization of pegylated galangin nanostructured lipid carriers and oral pharmacokinetics evaluation [J]. *Chin Tradit Herb Drugs*, 2023, 54(14): 4455-4466.

[11] Feltrin F D S, Agner T, Sayer C, et al. Curcumin encapsulation in functional PLGA nanoparticles: A promising strategy for cancer therapies [J]. *Adv Colloid Interface Sci*, 2022, 300: 102582.

[12] Zhang D, Liu L, Wang J, et al. Drug-loaded PEG-PLGA nanoparticles for cancer treatment [J]. *Front Pharmacol*, 2022, 13: 990505.

[13] Song X L, Wang J, Xu Y, et al. Surface-modified PLGA nanoparticles with PEG/LA-chitosan for targeted delivery of arsenic trioxide for liver cancer treatment: Inhibition effects enhanced and side effects reduced [J]. *Colloids Surf B Biointerfaces*, 2019, 180: 110-117.

[14] 陈莹子, 朱蓉, 孙旭怡, 等. 高良姜素-PLGA 纳米粒的处方优化及其表征 [J]. *海南医学院学报*, 2021, 27(11): 809-813, 819.

Chen Y Z, Zhu R, Sun X Y, et al. Prescription optimization and characterization of galangin-PLGA nanoparticles [J]. *J Hainan Med Univ*, 2021, 27(11): 809-813, 819.

[15] Feng W H, Zhang H H, Zhang Y, et al. Determination of galangin in rat plasma by UPLC and pharmacokinetic study [J]. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 2015, 998-999: 26-30.

[16] Xiong S, Hong Z, Huang L S, et al. IL-1 β suppression of VE-cadherin transcription underlies sepsis-induced inflammatory lung injury [J]. *J Clin Invest*, 2020, 130 (7):

- 3684-3698.
- [17] Zhao Y N, Li B, Deng H T, et al. Galangin alleviates alcohol-provoked liver injury associated with gut microbiota disorder and intestinal barrier dysfunction in mice [J]. *J Agric Food Chem*, 2024, 72(40): 22336-22348.
- [18] Zhao Y N, Li B, Liu J, et al. Galangin prevents against ethanol-induced intestinal barrier dysfunction and NLRP3 inflammasome activation via NF- κ B/MAPK signaling pathways in mice and caco-2 cells [J]. *J Agric Food Chem*, 2024.
- [19] Huang X, Zhang X, Machireddy N, et al. Endothelial FoxM1 reactivates aging-impaired endothelial regeneration for vascular repair and resolution of inflammatory lung injury [J]. *Sci Transl Med*, 2023, 15(709): eabm5755.
- [20] Zhai Z Q, Fu Y, Zhang X Y, et al. Liposomes loaded with quercetin for resolution of lung inflammation in a lipopolysaccharide-induced mouse model of sepsis [J]. *Biomed Mater*, 2023, 18(3): 035004.
- [21] Chen K, Xue R, Geng Y P, et al. Galangin inhibited ferroptosis through activation of the PI3K/AKT pathway *in vitro* and *in vivo* [J]. *FASEB J*, 2022, 36(11): e22569.
- [22] Qian Z Y, Suo R. Galangin reduces vascular endothelial cell dysfunction via Heme oxygenase-1 signaling [J]. *Vascular*, 2023, 31(4): 818-827.
- [23] Zhang F, Yan Y, Zhang L M, et al. Pharmacological activities and therapeutic potential of galangin, a promising natural flavone, in age-related diseases [J]. *Phytomedicine*, 2023, 120: 155061.
- [24] Shu G J, Chen K, Li J Y, et al. Galangin alleviated Doxorubicin-induced cardiotoxicity by inhibiting ferroptosis through GSTP1/JNK pathway [J]. *Phytomedicine*, 2024, 134: 155989.
- [25] Yang T, Liu H Q, Yang C B, et al. Galangin attenuates myocardial ischemic reperfusion-induced ferroptosis by targeting Nrf2/Gpx4 signaling pathway [J]. *Drug Des Devel Ther*, 2023, 17: 2495-2511.
- [26] Chaihongsa N, Maneesai P, Sangartit W, et al. Galangin alleviates vascular dysfunction and remodelling through modulation of the TNF-R1, p-NF- κ B and VCAM-1 pathways in hypertensive rats [J]. *Life Sci*, 2021, 285: 119965.
- [27] Thangaiyan R, Arjunan S, Govindasamy K, et al. Galangin attenuates isoproterenol-induced inflammation and fibrosis in the cardiac tissue of albino wistar rats [J]. *Front Pharmacol*, 2020, 11: 585163.
- [28] Karki R, Lee S, Mall R, et al. ZBP1-dependent inflammatory cell death, PANoptosis, and cytokine storm disrupt IFN therapeutic efficacy during coronavirus infection [J]. *Sci Immunol*, 2022, 7(74): eabo6294.
- [29] Karki R, Sharma B R, Tuladhar S, et al. Synergism of TNF- α and IFN- γ triggers inflammatory cell death, tissue damage, and mortality in SARS-CoV-2 infection and cytokine shock syndromes [J]. *Cell*, 2021, 184(1): 149-168.e17.
- [30] Almeida N B F, Fantone K M, Sarr D, et al. Variant-dependent oxidative and cytokine responses of human neutrophils to SARS-CoV-2 spike protein and anti-spike IgG1 antibodies [J]. *Front Immunol*, 2023, 14: 1255003.
- [31] Qiao X Y, Yin J H, Zheng Z H, et al. Endothelial cell dynamics in sepsis-induced acute lung injury and acute respiratory distress syndrome: Pathogenesis and therapeutic implications [J]. *Cell Commun Signal*, 2024, 22(1): 241.
- [32] Huang T P, Chen D Y, Ye W, et al. Effect and mechanism of apelin on lipopolysaccharide induced acute pulmonary vascular endothelial barrier dysfunction [J]. *Sci Rep*, 2023, 13(1): 1560.
- [33] Wilkens M, Holtermann L, Stahl A K, et al. Ubiquitination of VE-cadherin regulates inflammation-induced vascular permeability *in vivo* [J]. *EMBO Rep*, 2024, 25(9): 4013-4032.

[责任编辑 孙英杰]