

葡萄柚囊泡载红景天苷仿生纳米粒的制备及体外抗脑缺血损伤评价

胡婷婷^{1,2}, 史亚博^{1,2}, 朱安然^{1,2}, 李能进^{1,2}, 李佳乐^{1,2}, 张雯^{1,2}, 狄留庆^{1,2}, 王若宁^{1,2*}

1. 南京中医药大学药学院, 江苏 南京 210023

2. 江苏省中药高效给药系统工程技术研究中心, 江苏 南京 210023

摘要: 目的 制备经济高效、安全性高且具有强血脑屏障 (blood-brain barrier, BBB) 穿透能力的葡萄柚囊泡 (grapefruit exosome-like vesicles, GEVs) 载红景天苷 (salidroside, Sal) 仿生纳米粒 (GEVs/Sal), 并考察其体外抗脑缺血损伤作用。方法 采用差速离心法和超滤法提取 GEVs, 流式细胞术检测其特征性膜蛋白。采用超声破碎法制备 GEVs/Sal, 纳米颗粒跟踪分析对其粒径进行表征, HPLC 法测定载药量和包封率; 采用 Transwell 法考察 BBB 穿透及保护能力, 采用 MTT 法、免疫荧光染色、qRT-PCR 等技术考察 GEVs/Sal 对受损 PC12 细胞的保护作用。结果 GEVs 表达 CD81、CD9 特征性膜蛋白, 表明囊泡成功提取, 且 HPLC 显示 GEVs 中含有特征组分柚皮苷 (naringin, NAR), 有望与中药发挥协同增效作用; GEVs/Sal 的最佳处方比例为 $m_{\text{GEVs}} : m_{\text{Sal}} = 10 : 1$, 载药量、包封率、粒径和 Zeta 电位分别为 $(8.07 \pm 0.23) \%$ 、 $(91.08 \pm 2.65) \%$ 、 $(173.9 \pm 3.8) \text{ nm}$ 、 $(-11.49 \pm 0.48) \text{ mV}$; MTT 结果显示药物浓度在 $100 \mu\text{mol/L}$ 以内时, GEVs/Sal 对 PC12 细胞没有明显毒性作用, 且 $50 \mu\text{mol/L}$ 的 GEVs/Sal 能够显著改善氧糖剥夺/复氧 (oxygen glucose deprivation/reoxygenation, OGD/R) 诱导的 PC12 细胞活力; 进一步证明 PC12 细胞通过网格蛋白和脂筏作用介导了 GEVs/DiO 的内化; 通过构建体外 BBB 模型证明 GEVs/Sal 能有效穿过 BBB, 进一步确认 hCMEC/D3 细胞通过网格蛋白和巨胞饮作用介导 GEVs/DiO 的内化; FITC-Dextran 渗漏实验结果表明 GEVs/Sal 减少 OGD/R 损伤后 BBB 的通透性; Calcein-AM/PI 染色检测及线粒体功能考察发现 GEVs/Sal 具有抗细胞凋亡、改善线粒体膜电位、恢复细胞能量代谢过程的作用。通过 qRT-PCR 分析表明, GEVs/Sal 升高了 B 淋巴细胞瘤-2 (B cell lymphoma 2, *Bcl-2*) 的基因表达, 降低了 *Bcl-2* 相关 X 蛋白 (*Bcl-2*-associated X protein, *Bax*) 和半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-3 (cysteine containing cysteinyl aspartate-3, *Caspase-3*) 的基因表达, 从而发挥抑制细胞凋亡的作用。此外, 免疫荧光染色表明 GEVs/Sal 干预可诱导 BV2 细胞向 M2 型极化, 并介导抗炎作用。结论 成功制备高效载药、性质稳定的仿生纳米药物递送平台 GEVs/Sal, 并证明其对 OGD/R 引发的神经元损伤具有良好神经保护效果, 有望为缺血性脑卒中提出了一种新的治疗策略。

关键词: 红景天苷; 葡萄柚囊泡; 缺血性脑卒中; 仿生纳米粒; 再灌注损伤

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2025)19-6934-13

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2025.19.006

Preparation of grapefruit exosome-like vesicle-loaded salidroside biomimetic nanoparticles and *in vitro* evaluation of anti-cerebral ischemic injury

HU Pingting^{1,2}, SHI Yabo^{1,2}, ZHU Anran^{1,2}, LI Nengjin^{1,2}, LI Jiale^{1,2}, ZHANG Wen^{1,2}, DI Liuqing^{1,2}, WANG Ruoning^{1,2}

1. School of Pharmacy, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210023, China

2. Jiangsu Provincial TCM Engineering Technology Research Center of High Efficient Drug Delivery System, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210023, China

Abstract: Objective To prepare inexpensive, safe and non-toxic grapefruit exosome-like vesicles (GEVs) loaded with salidroside (Sal) bionanoparticles (GEVs/Sal) with strong blood-brain barrier (BBB) penetration capacity, and to investigate their anti-ischemic

收稿日期: 2025-04-12

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (82274104); 国家自然科学基金资助项目 (82074024); 国家自然科学基金资助项目 (82374042); 中药制药过程控制与智能制造技术国家重点实验室创新项目 (NZYSKL240103); 江苏省优秀青年基金项目 (BK20240144); 南京中医药大学优青培育项目 (RC202407); 大学生创新创业项目 (202210315056Y, 202310315055Z)

作者简介: 胡婷婷, 本科生, 研究方向为中药制剂新技术与新剂型。E-mail: 042122115@njucm.edu.cn

*通信作者: 王若宁, 教授, 博士生导师, 从事中药制剂新技术与新剂型。E-mail: ruoningw@njucm.edu.cn

injury effects *in vitro*. **Methods** GEVs were extracted by differential centrifugation and ultrafiltration, and their characteristic membrane proteins were detected by flow cytometry. GEVs/Sal were prepared by ultrasonic fragmentation, characterized by nanoparticle tracking analysis for particle size, and HPLC for drug loading and encapsulation rates; Transwell method was used to investigate the BBB penetration and protective ability; MTT method, immunofluorescence staining and qRT-PCR were used to investigate the protective effect of GEVs/Sal on damaged PC12 cells. **Results** GEVs expressed CD81 and CD9 characteristic membrane proteins, indicating that the vesicles were successfully extracted, and HPLC showed that GEVs contained the characteristic component naringin (NAR), which may play a synergistic role with the traditional Chinese medicine; The optimal preparation prescription ratio for GEVs/Sal was $m_{GEVs} : m_{Sal} = 10 : 1$, drug loading, encapsulation efficiency, particle size and zeta potential were $(8.07 \pm 0.23)\%$, $(91.08 \pm 2.65)\%$, (173.9 ± 3.8) nm, (-11.49 ± 0.48) mV, respectively; MTT assay result showed that concentration within $100 \mu\text{mol/L}$ of GEVs/Sal had no significant cytotoxicity on PC12 cells, and $50 \mu\text{mol/L}$ of GEVs/Sal significantly improved the viability of PC12 cells induced by oxygen glucose deprivation/reoxygenation (OGD/R); It was further demonstrated that PC12 cells mediated the internalization of GEVs/DiO through clathrin and lipid raft interaction; It was demonstrated by constructing an *in vitro* BBB model that GEVs/Sal could effectively cross the BBB, and it was further confirmed that hCMEC/D3 cells mediated the internalization of GEVs/DiO through clathrin and macropinocytosis interaction; The results of FITC-Dextran leakage assay showed that GEVs/Sal reduced the permeability of the BBB after OGD/R injury; Calcein AM/PI staining and mitochondrial function investigation revealed that GEVs/Sal could inhibit cell apoptosis, improve mitochondrial membrane potential and restore cellular energy metabolism processes. qRT-PCR analysis showed that GEVs/Sal increased the gene expression of B cell lymphoma-2 (*Bcl-2*), decreased the gene expressions of Bcl-2 associated X protein (*Bax*) and cysteine containing cysteine aspartate-3 (*Caspase-3*), thereby exerting an inhibitory effect on cell apoptosis. In addition, immunofluorescence staining showed that GEVs/Sal intervention could induce polarization of BV2 cells towards M2 type and mediate anti-inflammatory effects. **Conclusion** GEVs/Sal, a highly efficient drug-carrying and stable biomimetic nanomedicine delivery platform, has been successfully prepared and has been demonstrated to have good neuroprotective effects against OGD/R-induced neuronal damage, suggesting a new therapeutic strategy for ischemic stroke. **Key words:** salidroside; grapefruit exosome-like vesicles; ischemic stroke; biomimetic nanoparticles; reperfusion injury

2021年,全球卒中死亡人数约730万,占死亡总数的10.7%^[1]。此外,缺血性脑卒中(ischemic stroke, IS)占脑卒中病例总数80%以上^[2]。目前临床上治疗IS的方法主要为机械取栓或注射重组组织纤溶酶原激活剂溶栓来恢复脑组织血供^[3-4]。尽管血管再通治疗能够恢复血流,但会引发以氧化应激、神经炎症、血脑屏障(blood-brain barrier, BBB)受损及细胞凋亡等为特征的缺血再灌注损伤(ischemia-reperfusion injury, IRI)^[5-7]。因此,针对IRI的神经保护策略可能提高治疗预后效果^[8]。

中医自古就以“中风”论治此病,将病机归纳为“气阴两亏,血脉受阻”,治疗上主要施用活血化瘀药^[9]。红景天属植物红景天 *Rhodiola rosea* L.具有益气活血、通脉平喘的功效,红景天苷(salidroside, Sal)为红景天的天然酚类活性成分,能够减少梗死面积,降低IS患者再灌注后的残疾率,在减轻IRI方面展现出巨大潜力^[10-12]。现代研究证实,Sal能够通过抑制细胞凋亡、抗氧化应激并保护BBB等方式防止大脑遭受缺血和缺氧损伤^[13-14]。然而,Sal的注射给药通常存在生物利用度低、循环时间短、BBB渗透差等问题,亟需设计理想的递药系统^[15-16]。

为了改善这些问题,仿生纳米药物递送系统已成为研究焦点,被广泛用于IS治疗药物的设计^[17-20]。葡萄柚囊泡(grapefruit extracellular vesicles, GEVs)是从葡萄柚汁中分离出的外泌体样纳米颗粒^[21],作为天然的植物囊泡,具有良好的生物相容性,能够延长Sal的血液循环时间^[14,22]。此外,GEVs内容物中的活性成分柚皮苷(naringin, NAR)具有强效抗氧化和自由基清除能力,有望协同Sal发挥神经保护的作用^[23-25]。GEVs的脂质双分子层还能够通过受体介导的内吞作用和膜融合途径跨越BBB,增加Sal在脑内的富集^[22]。

本研究拟开发一种制备成本低廉、安全无毒且具有强BBB穿透能力的仿生纳米药物递送平台(GEVs/Sal),在GEVs中荷载Sal,且囊泡表面特征组分NAR与Sal有望协同增效,以期提高制剂的BBB穿透能力和神经保护效果,为克服IS的治疗药物递送障碍提供一种新策略。

1 材料

1.1 细胞株

大鼠肾上腺嗜铬细胞瘤细胞PC-12(高分化,批号CL-0481)购自武汉普诺赛生命科技有限公司;

人脑微血管内皮细胞 hCMEC/D3 (批号 CBP61734) 购自南京贝斯特生物科技有限公司; 小鼠小胶质细胞 BV2 (批号 CC9007) 购自赛库生物。

1.2 药品与试剂

NAR (批号 B21594, 质量分数 $\geq 98\%$) 购自上海源叶生化科技有限公司; Sal (批号 F300-01, 质量分数 $\geq 98\%$) 购自南京狄尔格医药公司; PE-CD81 流式抗体 (批号 C4015)、APC-CD9 流式抗体 (批号 AC0089)、脂多糖 (lipopolysaccharide, LPS, 批号 ST1470) 购自上海碧云天生物科技有限公司; 胎牛血清 (批号 10099-141)、DMEM 高糖培养基 (批号 11965-092)、精氨酸酶 1 (arginase-1, Arg-1) 抗体 (批号 PA5-29645) 购自美国 Thermo Fisher Scientific 公司; 噻唑蓝 (批号 T818538) 购自上海麦克林生化科技有限公司; Calcein/PI 细胞活性与细胞毒性检测试剂盒 (批号 C2015M) 购自上海碧云天生物科技有限公司; 盐酸氯丙嗪 (批号 C131611)、甲基- β -环糊精 (批号 C262790)、阿米洛利 (批号 C196832) 购自上海阿拉丁科技股份有限公司; FITC-葡聚糖 (批号 S07621-5) 购自南京诺唯赞生物科技股份有限公司; 线粒体膜电位检测试剂盒 (JC-1, 批号 BL711A)、DiO 染色剂 (批号 BL777A)、DAPI 染色剂 (批号 BL105A) 购自 Biosharp 生物科技有限公司; 超氧化物歧化酶 (superoxide dismutase, SOD) 检测试剂盒 (批号 BC0175)、谷胱甘肽过氧化物酶 (glutathione peroxidase, GSH-Px) 检测试剂盒 (批号 BC0235)、丙二醛 (malondialdehyde, MDA) 检测试剂盒 (批号 BC0020)、活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 检测试剂盒 (批号 CA1410)、三磷酸腺苷 (adenosine triphosphate, ATP) 检测试剂盒 (批号 BC0300) 购自北京索莱宝科技有限公司; 线粒体膜电位检测试剂盒 (JC-1) (批号 GC1796) 购自 Biosharp 生物科技有限公司; 小鼠白细胞介素-1 β (interleukin-1 β , IL-1 β) ELISA 试剂盒 (批号 BS-E5263M1)、小鼠 IL-6 ELISA 试剂盒 (批号 BS-E3923M1)、小鼠肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α) ELISA 试剂盒 (批号 BS-E9347M1) 购自南京迈博生物科技有限公司; Trizol 总 RNA 抽提试剂盒 (批号 B511311-0025) 购自上海生工生物工程股份有限公司; qPCR 试剂盒 (批号 13600ES)、cDNA 反转录试剂盒 (批号 15662ES) 购自上海翌圣生物科技股份有限公司; 诱导型一氧化氮合酶 (inducible nitric

oxide synthase, iNOS) 抗体 (批号 W16030C) 购自北京 BioLegend 生物科技有限公司。

1.3 仪器

CytoFLEX S 型多色分析型流式细胞仪 (美国 Beckman 公司); Centrivap 离心浓缩仪 (美国 LABCONCO 公司); e2695 型高效液相色谱仪 (美国 Waters 公司); Axio Vert A1 型倒置荧光显微镜 (德国 Zeiss 公司); EnVision 多功能酶标仪 (美国 PerkinElmer 公司); JEM-F200 型透射电镜 (深圳市蓝星宇电子科技有限公司); 939SZ 型粒度电位仪 (澳谱特科技有限公司); MA-6000 型 qRT-PCR 仪 (美国 Thermo Fisher Scientific 公司); ProteoAnalyzer 电泳仪 (美国安捷伦科技有限公司)。

2 方法

2.1 GEVs/Sal 的制备与表征

2.1.1 GEVs 的提取纯化 新鲜葡萄柚榨汁后, 差速离心 (2 000 $\times g$ 离心 20 min, 5 000 $\times g$ 离心 30 min, 15 000 $\times g$ 离心 1 h) 以去除大颗粒和纤维。收集上清液依次经过 1×10^5 、 1×10^4 滤膜超滤纯化获得滤液, 即得 GEVs。

2.1.2 GEVs 的特征膜蛋白表征 采用流式细胞术表征 GEVs 表面的特征膜蛋白。将 GEVs 样品加入流式管中, 分别加入 PE-CD81、APC-CD9 流式抗体, 并设置同型对照。冰上避光孵育 10 min 后通过流式细胞术测定荧光强度, 检测蛋白表达情况。

2.1.3 GEVs 的 NAR 含量测定 采用 HPLC 法测定 GEVs 特征组分 NAR 的含量。取 5 mg GEVs, 加入适量的无水乙醇, 使其为悬浮状态, 于 90 $^{\circ}\text{C}$ 水浴加热 2 h, 冷却至 22 $^{\circ}\text{C}$, 滤过, 进行 HPLC 分析。色谱条件: DS HYPERSIL C₁₈ 色谱柱 (250 mm \times 4.6 mm, 5 μm), 流动相为乙腈 (A)-水 (B), 梯度洗脱: 0~8 min, 77% B; 8~15 min, 77%~35% B; 15~20 min, 35%~30% B; 20~21 min, 30%~77% B; 21~22 min, 77% B。检测波长 280 nm; 体积流量 1 mL/min; 柱温 25 $^{\circ}\text{C}$; 进样量 20 μL 。

2.1.4 GEVs/Sal 的制备及表征 将 Sal 与 GEVs 混合均匀, 冰浴条件下超声载药, 功率为 120 W, 破碎时间为 2 s 开/5 s 关, 使 Sal 加载到 GEVs 的亲水核心, 37 $^{\circ}\text{C}$ 条件下恒温孵育 1 h 以使膜结构闭合。以载药量 (drug loading, DL)、封装率 (encapsulation efficiency, EE)、粒径和 Zeta 电位为考察指标, 对超声时间、Sal 与 GEVs 的质量比 ($m_{\text{Sal}} : m_{\text{GEVs}}$) 进行优化考察, 得到在最佳工艺条件下制备的

GEVs/Sal。

取少量 GEVs 纳米粒溶液，用超纯水稀释至适当浓度，滴于 200 目碳膜铜网上，室温晾干后，用 2% 磷钨酸负染，晾干，在透射电镜下观察 GEVs 的形态。

2.1.5 GEVs/Sal 指标的测定 取适量 GEVs/Sal 溶液转移至 3×10^4 超滤管中，4 °C、2 500 r/min 离心 5 min，取内管溶液进行 HPLC 检测。色谱条件：DS HYPERSIL C₁₈ 色谱柱（250 mm×4.6 mm，5 μm），以甲醇-水（15：85）为流动相进行等度洗脱。检测波长 275 nm；体积流量 1.0 mL/min；柱温 30 °C；进样量 10 μL。计算 GEVs/Sal 的 DL、EE。

$$DL = W_i / (W_0 + W)$$

$$EE = W_i / W_0$$

W_0 为投入 Sal 的质量； W_i 为 GEVs/Sal 中包载 Sal 的质量； W 为制剂的质量

取 500 μL GEVs/Sal，超纯水稀释 10 倍后，于粒度电位仪上测定粒径和 Zeta 电位，平行测定 3 次取均值。

2.1.6 GEVs/Sal 的稳定性考察 将适量 GEVs/Sal 保存于 4 °C，连续测定 5 d 粒径分布，观察制剂在 5 d 内于 4 °C 放置的稳定性。为探索制剂在血清中的稳定性，将 GEVs/Sal 与含 10% 胎牛血清的 DMEM 高糖培养基等体积混合，连续测定 5 d 粒径。

2.1.7 GEVs/Sal 的药物体外释放行为考察 取适量 PBS 缓冲液，滴加浓盐酸调节 pH 至 6.7，备用。吸取 1.0 mL GEVs/Sal 和 Sal，分别加入到透析袋（截留相对分子质量为 3×10^3 ），并放置于 50 mL PBS 溶液（pH 6.7）中。室温下不断搅拌，分别在 0、0.25、0.5、1、2、4、6 h 时收集释放介质同时补充等体积溶液。HPLC 测定释放的药物量，计算药物累积释放率（ Q ）。

Q = 不同时间点测得的释放介质中药物的量 / 制剂中含有该药物的总量

2.2 GEVs/Sal 体外神经保护作用研究

2.2.1 氧糖剥夺/复氧（oxygen glucose deprivation/reoxygenation, OGD/R）细胞模型的建立 取对数生长期的 PC12 细胞接种于 96 孔板，过夜贴壁生长后弃去培养液。加入 DMEM 无糖培养液，置缺氧小室（95% N₂、5% CO₂），并在 37 °C 培养箱中培养 6 h 后，更换为正常培养液，复氧复糖培养 24 h。

2.2.2 GEVs/Sal 对 PC12 细胞活力的影响 将 PC12 细胞以 1×10^5 个/mL 接种于 96 孔板，每孔

100 μL，于 37 °C、5% CO₂ 培养箱中过夜贴壁生长后弃去培养液。各给药组加入 100 μL 不同浓度（6.25、12.50、25.00、50.00、100.00 μmol/L）的 GEVs/Sal，对照组加入不含药物的培养基，另设置不接种细胞的空白孔，继续培养 24 h。每孔加入含 10% MTT（5 mg/mL）的完全培养基 100 μL，37 °C 避光孵育 4 h。弃上清液，每孔加入 100 μL 二甲基亚砷振荡混匀 10 min 以充分溶解底部晶体，并使用酶标仪在 490 nm 波长处测定各孔吸光度（ A ）值，计算细胞活力。

$$\text{细胞活力} = (A_{\text{给药}} - A_{\text{空白}}) / (A_{\text{对照}} - A_{\text{空白}})$$

2.2.3 GEVs/Sal 对 OGD/R 处理的 PC12 细胞活力的影响 将 PC12 细胞以 1×10^5 个/mL 接种于 96 孔板，过夜贴壁生长后弃去培养液，进行 OGD/R 处理。按“2.2.2”项下方法测定细胞活力。

2.2.4 GEVs/Sal 对神经元细胞的保护作用 将 PC12 细胞以 1×10^5 个/mL 接种于 96 孔板，过夜贴壁生长后弃去培养液。设置对照组、模型组、Sal 组和 GEVs/Sal 组，对照组常规培养，模型组和给药组进行 OGD/R 处理，给药组给予 50 μmol/L Sal 或 GEVs/Sal 干预，培养 24 h。弃去上清液，使用预冷的 PBS 缓冲液轻柔洗涤细胞 2 次。将 Calcein-AM 和 PI 等体积混合后加入各孔，37 °C 避光孵育 30 min。通过倒置荧光显微镜观察细胞存活状态，并应用 Image J 软件测定活细胞（绿色荧光）和死细胞（红色荧光）的比例，以评估药物的神经保护作用。

2.2.5 PC12 细胞摄取 GEVs/Sal 的机制研究 以不同的细胞内吞抑制剂（5 mmol/L 盐酸氯丙嗪、10 mmol/L 甲基-β-环糊精、5 mmol/L 阿米洛利）预先处理 PC12 细胞 30 min 后，给予以 DiO 荧光染料标记的 GEVs（GEVs/DiO）处理细胞 4 h，测定细胞摄取 GEVs/DiO 的荧光强度。

2.2.6 GEVs/Sal 的体外 BBB 穿透能力考察 将 hCMEC/D3 细胞以 1×10^5 个/mL 接种于 24 孔板 Transwell 上室，隔天更换细胞培养液并测定跨膜电阻值，待电阻值超过 $200 \Omega \cdot \text{cm}^2$ ，于下室接种 PC12 细胞，待细胞过夜贴壁生长后弃去培养液。给予上室细胞 DiO-GEVs 和游离 DiO。培养 12 h 后，使用荧光酶标仪定量监测 GEVs/Sal 与游离 DiO 自上室转移至下室 PC12 细胞中的运输情况，评估 GEVs/Sal 在体外 BBB 模型中的跨膜转运效率。

以不同的细胞内吞抑制剂（5 mmol/L 盐酸氯丙嗪、10 mmol/L 甲基-β-环糊精、5 mmol/L 阿米洛利）

预先处理 hCMEC/D3 细胞 30 min 后, 给予 GEVs/DiO 处理细胞 4 h, 测定细胞摄取 GEVs/DiO 的荧光强度。

2.2.7 GEVs/Sal 的体外 BBB 渗透效率考察 成功构建体外 BBB 模型后, 把 Transwell 小室置于 24 孔板内, 在下室接种 PC12 细胞 (3×10^5 个/mL)。待细胞过夜贴壁后对下室进行 OGD/R 处理并添加 Sal 和 GEVs/Sal。药物作用 24 h 后, 于上室中加入 0.5 mL FITC-Dextran (0.1 mg/mL, $\lambda_{Ex}/\lambda_{Em} = 485/538$ nm), 置于培养箱内孵育 2 h。避光收集每孔上下室中 200 μ L 培养液, 加入 96 孔板, 使用酶标仪测定 A 值, 计算各组通透性 (P_a)。

$$P_a = \frac{[A]}{t} \times \frac{1}{A} \times \frac{V}{[L]}$$

[A]为下室荧光强度; t 为 FITC-Dextran 孵育时间 (s); A 为小室滤膜面积 (cm^2); V 为下室液体量; [L]为上室荧光强度

2.2.8 GEVs/Sal 对线粒体功能作用考察 采用 JC-1 荧光探针法评估 GEVs/Sal 对 OGD/R 处理的 PC12 细胞线粒体膜电位的变化。将 PC12 细胞以 1×10^5 个/mL 接种于 96 孔板, 待细胞过夜贴壁后进行 OGD/R 处理并给药干预 24 h。PBS 洗涤 2 次, 加入 JC-1 工作液, 37 $^{\circ}\text{C}$ 避光孵育 20 min。JC-1 缓冲液漂洗 2 次后更换为新鲜培养基, 于荧光显微镜下观察线粒体膜电位变化, 采用 Image J 软件定量分析荧光强度。同时, 采用 ATP 含量检测试剂盒检测 PC12 细胞中 ATP 含量, 探究 GEVs/Sal 对线粒体功能的影响。

2.2.9 GEVs/Sal 改善神经元细胞凋亡作用考察 采用 qRT-PCR 检测 GEVs/Sal 对 OGD/R 处理的 PC12 细胞凋亡相关基因表达的影响。将 PC12 细胞以 2×10^5 个/mL 接种于 6 孔板, 2 mL/孔, 待细胞过夜贴壁后进行 OGD/R 处理并给药干预 24 h。收集细胞, PBS 洗涤, 采用 Trizol 总 RNA 抽提试剂盒提取总 RNA, 采用反转录试剂盒逆转录合成 cDNA, qRT-PCR 法检测各组细胞抗凋亡蛋白 B 淋巴细胞瘤-2 (B cell lymphoma-2, *Bcl-2*) 和促凋亡蛋白 Bcl-2 相关 X 蛋白 (Bcl-2-associated X protein, *Bax*)、半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-3 (cysteine containing cysteinyl aspartate-3, *Caspase-3*) 的基因表达情况。反应体系: SYBR 6 μ L, 上/下游引物各 0.5 μ L, cDNA 模板 1 μ L, 加 RNase Free ddH₂O 至 10 μ L。扩增程序: 95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min; 95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 10 s, 60 $^{\circ}\text{C}$ 退火 20 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 20 s, 40 个循环。

溶解曲线参数采用仪器默认参数。以甘油醛-3-磷酸脱氢酶 (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, *GAPDH*) 为内参基因, 采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法分析 mRNA 相对表达量, 引物序列见表 1。

表 1 引物序列
Table 1 Primer sequences

基因	序列 (5'-3')
<i>Bcl-2</i>	F: CGGGAGAACAGGGTATGA R: CAGAGACAGCCAGGAGAA
<i>Bax</i>	F: AGGGTTTCATTCCAGGATCGAGC R: AGGCGGTGAGGACTCCAGCC
<i>Caspase-3</i>	F: CCTGAAATGGGCTTGTGT R: TGTCTCAATACCGCAGTC
<i>GAPDH</i>	F: GATTCTTGCCATCAACGACC R: GTGCAGGATGCATTGCTGAC

2.2.10 GEVs/Sal 抗氧化应激作用考察 采用 DCFH-DA 活细胞探针对细胞内 ROS 水平进行检测。将 PC12 细胞以 1×10^5 个/mL 接种于 96 孔板, 过夜贴壁后, 进行 OGD/R 处理并给药干预 24 h。弃去培养基, PBS 清洗细胞, 加入含 10 μ mol/L DCFH-DA 的无血清培养基, 37 $^{\circ}\text{C}$ 避光孵育 20 min 后, 用无血清 DMEM 洗涤细胞 3 次, 荧光显微镜下观察。此外, 将 PC12 细胞以 2×10^5 个/mL 接种于 6 孔板中, 经同样处理后, 按照试剂盒说明书检测细胞内 MDA 水平和 GSH-Px 活性、SOD 活性。

2.2.11 GEVs/Sal 抗炎作用考察 将 PC12 细胞以 2×10^5 个/mL 接种于 6 孔板中, 待细胞完全贴壁后进行 OGD/R 处理并给药干预 24 h。收集上清液, 按照试剂盒说明书测定 TNF- α 、IL-1 β 和 IL-6 水平。

2.2.12 GEVs/Sal 调节小胶质细胞极化作用考察 采用免疫荧光法检测小胶质细胞极化标志物 Arg-1 和 iNOS 表达。BV2 细胞于 24 孔板中贴壁培养后, 加入含 LPS (1 μ g/mL) 的培养基处理 24 h 以诱导炎症。给药处理 24 h 后, 用 PBS 缓冲液清洗细胞, 用 4% 多聚甲醛溶液固定细胞, 孵育 10 min。洗涤细胞 3 次 (5 min/次), 用 Triton X-100 在室温下透化 10 min; 用 5% 牛血清白蛋白溶液在室温下封闭细胞表面 30 min, 将荧光标记的 Arg-1 和 iNOS 抗体加入到细胞中, 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜; 用 DAPI 染色细胞核, 在倒置荧光显微镜下观察细胞中 Arg-1、iNOS 的荧光强度, 比较各组 Arg-1 和 iNOS 的表达水平。

2.3 统计学分析

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 用 Microsoft Excel 2019、GraphPad Prism 6.0 及 SPSS 21.0 软件进行统计分

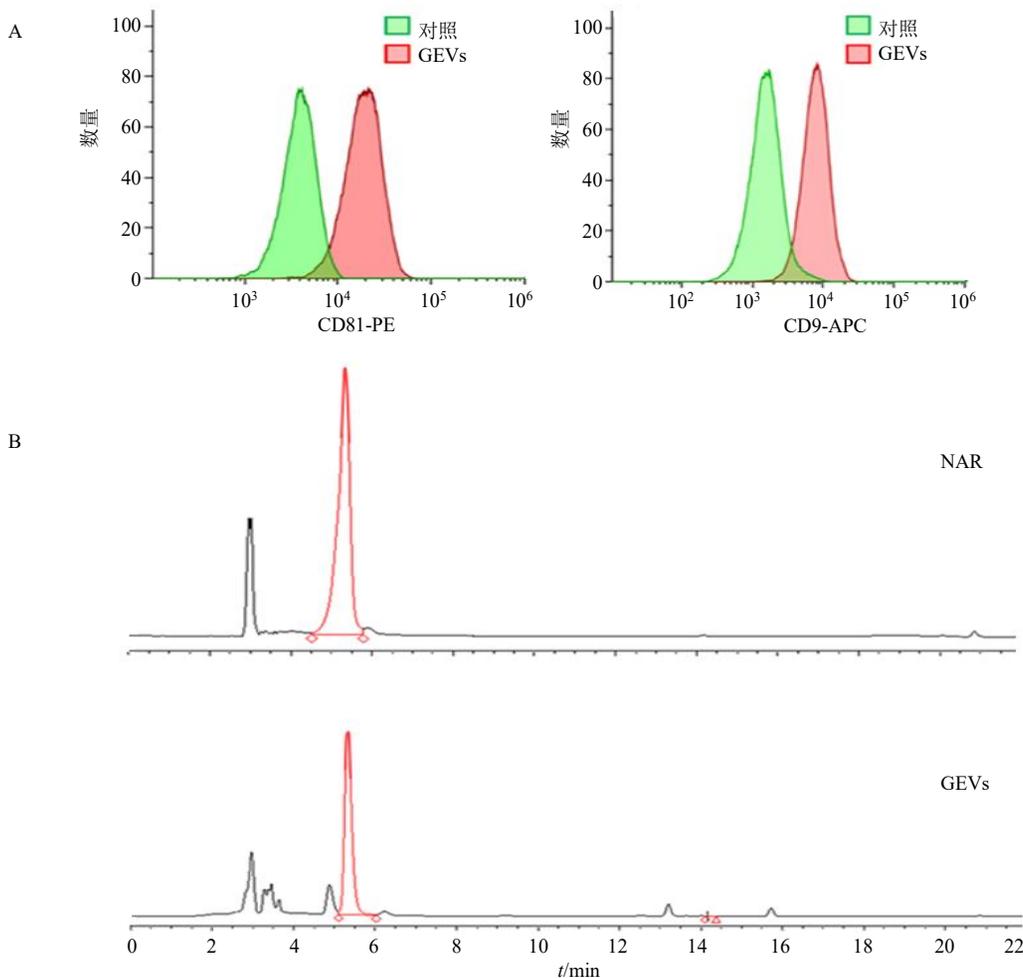
析。对于多组数据比较,采用单因素 ANOVA 检验;两组数据间比较则采用独立样本 Student's *t* 检验。采用 Image J 软件对结果进行定量分析。

3 结果

3.1 GEVs 的表征结果

采用差速离心和超滤法制得的 GEVs 平均粒径为

117.7 nm。CD81、CD9 是外泌体的特征检测标志^[26-27]。与同型对照组相比,流式细胞术检测 GEVs 中 CD81、CD9 均阳性表达(图 1-A),表明 GEVs 提取工艺可行,保留了外泌体表面特征蛋白。同时,HPLC 检测到 GEVs 与 NAR 对照品在相同保留时间出峰,说明 GEVs 中含有特征性组分 NAR(图 1-B)。



A-流式细胞术表征 GEVs 蛋白; B-HPLC 鉴定 GEVs 中 NAR 成分。

A-flow cytometry analysis of protein expression on surface of GEVs; B-HPLC detection of GEVs containing characteristic component NAR.

图 1 GEVs 表征结果

Fig. 1 Characterization results of GEVs

3.2 GEVs/Sal 的制备工艺参数优化及表征结果

采用超声破碎法制备得到负载 Sal 的仿生纳米颗粒 GEVs/Sal。以 DL、EE、粒径和 Zeta 电位为指标,对制备时处方中 Sal 的投入量 ($m_{\text{GEVs}} : m_{\text{Sal}} = 5 : 1、10 : 1、15 : 1$) 进行考察。结果如表 2 所示, $m_{\text{GEVs}} : m_{\text{Sal}}$ 值增加的同时,粒径先减小后增大,DL、EE 和 Zeta 电位绝对值则呈现先增加后减小的趋势,可见 $m_{\text{GEVs}} : m_{\text{Sal}}$ 值对 GEVs/Sal 指标的影响较大。当 $m_{\text{GEVs}} : m_{\text{Sal}}$ 为 10 : 1 时,制备所得 GEVs/Sal 的

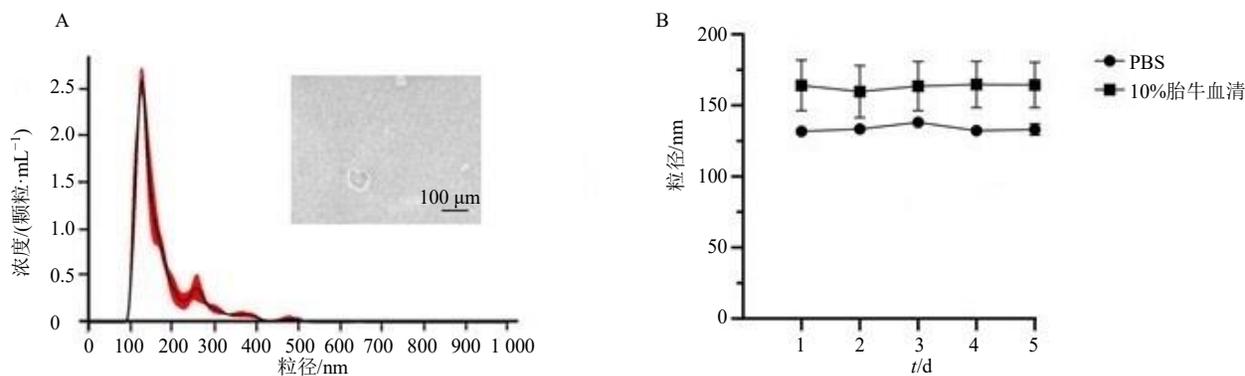
各项指标相对较佳,DL 和 EE 分别为 (8.07 ± 0.23)%、(91.08 ± 2.65)%,粒径为 (173.9 ± 3.8) nm,Zeta 电位为 (-11.49 ± 0.48) mV。故后续选择该比例进行制剂制备。

透射电镜观察形态,发现 GEVs 形貌完整,呈典型茶托状或凹陷半球状,有明显的双层膜结构。超声载药后 GEVs/Sal 平均粒径为 173.4 nm(图 2-A),具有较小的粒径和较好的均一性。为评估 GEVs/Sal 在低温条件下的储存稳定性,将新制备的

表 2 不同 GEVs、Sal 投料比对 GEVs/Sal 载药量、封装率、粒径和 Zeta 电位的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 2 Effect of different GEVs, Sal feeding ratios on GEVs/Sal loading, encapsulation rate, particle size and Zeta potential ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

$m_{GEVs} : m_{Sal}$	DL/%	EE/%	粒径/nm	Zeta 电位/mV
5 : 1	2.67 ± 0.08	66.82 ± 2.08	188.4 ± 16.3	-9.24 ± 0.34
10 : 1	8.07 ± 0.23	91.08 ± 2.65	173.9 ± 3.8	-11.49 ± 0.48
15 : 1	4.44 ± 0.11	65.36 ± 1.59	196.0 ± 5.6	-9.65 ± 0.26



A-GEVs/Sal 的粒径及形态; B-GEVs/Sal 在 PBS 及 10%胎牛血清中 5 d 内的稳定性。
A-particle size and morphology of GEVs/Sal; B-stability of GEVs/Sal in PBS and 10% fetal bovine serum for 5 d.

图 2 GEVs/Sal 的表征结果 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 2 Characterization results of GEVs/Sal ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

样品置于 4 °C 环境中保存, 每日采用动态光散射技术检测颗粒尺寸分布, 持续监测 5 d。如图 2-B 所示, 在整个观察周期内, GEVs/Sal 的粒径保持恒定, 显示出良好的物理稳定性。5 d 内 GEVs/Sal 在 10% 胎牛血清中的大小几乎保持不变, 显示出其在血液循环过程中可以保持其结构完整性。

3.3 GEVs/Sal 的药物体外释放行为考察

采用透析袋法考察 GEVs/Sal 中 Sal 的药物释放情况。采用 pH 值为 6.7 的 PBS 溶液模拟脑缺血的酸性环境。结果如图 3 所示, 由于 Sal 是水溶性

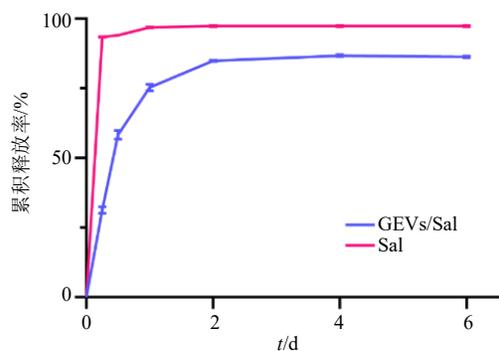


图 3 GEVs/Sal 及 Sal 的累积释放曲线 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 3 Cumulative release curves of GEVs/Sal and Sal ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

药物, 能极易渗透在 PBS 介质中, 因此在药物释放 15 min 时即达到 (93.44 ± 0.14)% 的释放量。此时 GEVs/Sal 的累积释放率为 (31.33 ± 1.24)%, 在 4 h 达到 (86.69 ± 0.36)%, 说明 Sal 被有效地包载到了 GEVs 中。以上结果表明囊泡的存在减缓了 Sal 的释放, 可以使药物持续释放, 为药物治疗疾病提供条件。

3.4 GEVs/Sal 对 PC12 细胞的细胞毒性考察

如图 4 所示, 与对照组比较, 不同浓度的 GEVs/Sal 对 PC12 细胞活力无明显影响, 表明

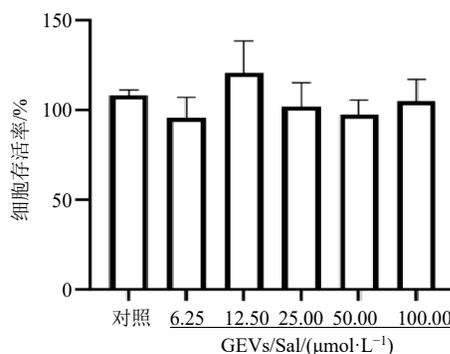


图 4 不同浓度的 GEVs/Sal 的体外细胞毒性考察 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 4 *In vitro* cytotoxicity investigation of different concentrations of GEVs/Sal ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

GEVs/Sal 具有良好的细胞安全性。

3.5 GEVs/Sal 对神经元细胞的保护作用

PC12 细胞经 OGD/R 处理后, 给予不同浓度的 GEVs/Sal, 通过 MTT 法测定细胞活力。如图 5 所示, 与对照组比较, 50 $\mu\text{mol/L}$ GEVs/Sal 显著提高 OGD/R 处理的 PC12 细胞活力 ($P < 0.01$)。因此, 后续实验将 50 $\mu\text{mol/L}$ 确定为 GEVs/Sal 的最佳实验浓度。

采用 Calcein-AM/PI 染色评估 GEVs/Sal 对 OGD/R 处理的 PC12 细胞的保护作用。如图 6 所示, 与模型组比较, GEVs/Sal 处理显著减少细胞死亡 ($P < 0.001$), 表明其可有效缓解 OGD/R 诱导的细胞损伤, GEVs 的引入可以协同 Sal 发挥神经保护作用, 可能与活性组分 NAR 的存在有关。

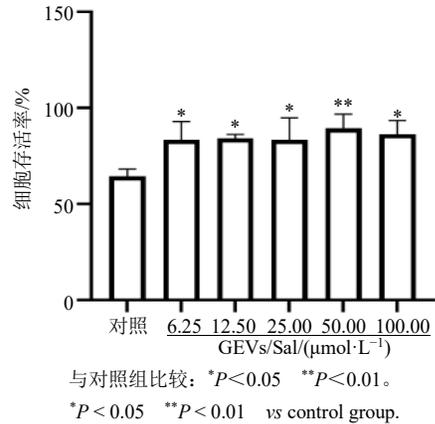


图 5 GEVs/Sal 对 OGD/R 处理的 PC12 细胞活力的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 5 Effect of GEVs/Sal on viability of PC12 cells treated with OGD/R ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

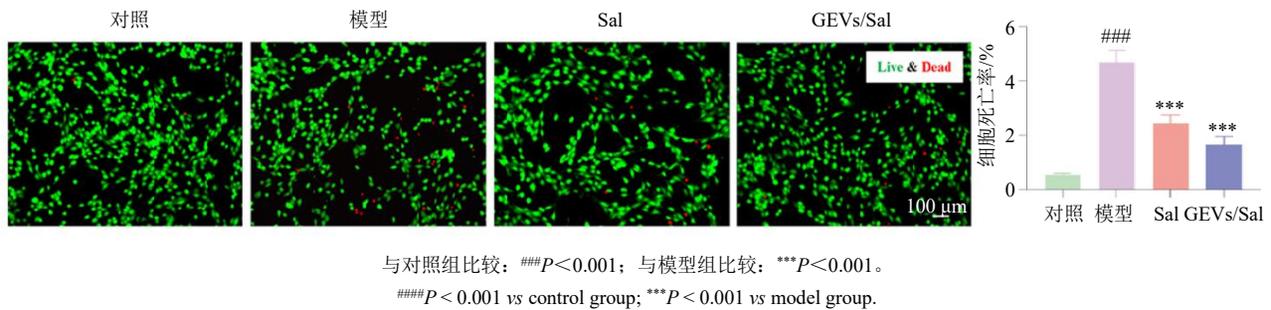


图 6 Calcein-AM/PI 染色检测 GEVs/Sal 对受损 PC12 细胞的保护作用 ($\times 10; \bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 6 Protective effect of GEVs/Sal on damaged PC12 cells detected by Calcein AM/PI dual fluorescence staining ($\times 10; \bar{x} \pm s, n = 3$)

3.6 PC12 细胞摄取 GEVs/Sal 的机制研究

如图 7 所示, 给予甲基- β -环糊精和盐酸氯丙嗪处理后, PC12 细胞对 GEVs/DiO 的摄取量分别降低

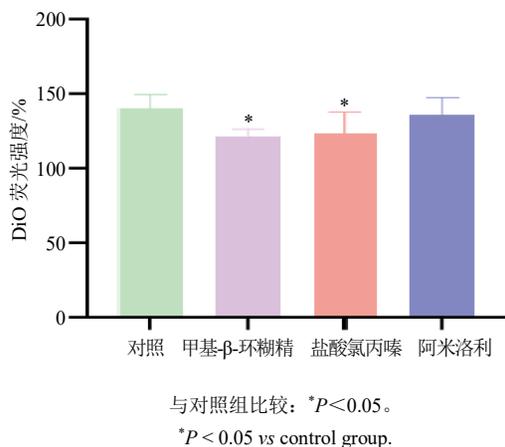


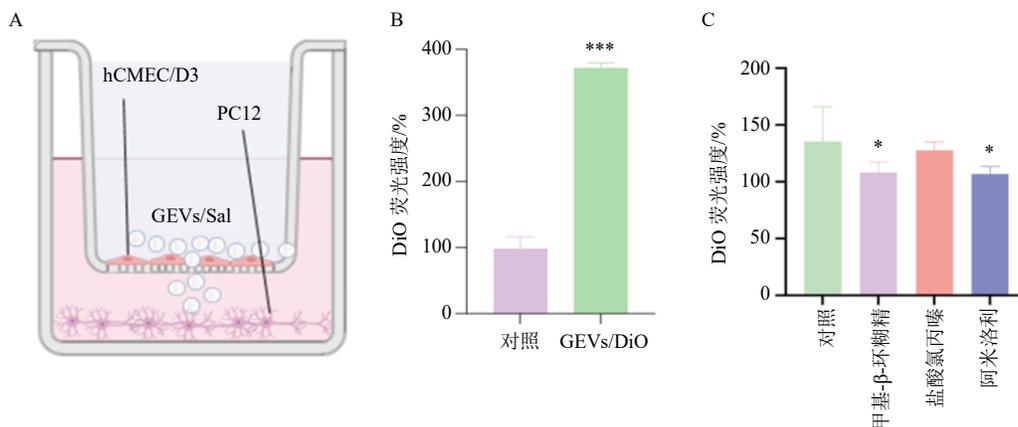
图 7 PC12 细胞对 GEVs/DiO 的摄取量 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 7 Uptake of GEVs/TiO by PC12 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

13.3%和 12.3%; 给予阿米洛利处理后, PC12 细胞对 GEVs/DiO 的摄取量与对照组相比没有明显变化, 表明 PC12 细胞对 GEVs/DiO 的内化过程是网格蛋白和脂筏作用介导的。

3.7 GEVs/Sal 的体外 BBB 穿透能力考察结果

针对 BBB 对药物递送的限制作用, 重点考察了 GEVs/Sal 的跨屏障转运潜能。如图 8-A 所示, 采用 Transwell 培养系统模拟 BBB 结构。如图 8-B 所示, 相比于游离 DiO 组, GEVs/Sal 能够成功穿越 BBB, 并且被 PC12 细胞摄取, PC12 细胞对 GEVs/Sal 的摄取量比 DiO 高出 3.8 倍, 说明 GEVs/Sal 高效穿越 BBB 的能力。如图 8-C 所示, 进一步对 GEVs/Sal 透过 BBB 的机制进行初步探讨, 给予甲基- β -环糊精或阿米洛利处理后, hCMEC/D3 细胞对 GEVs/DiO 的摄取量分别降低 20.5%和 21.2%; 给予盐酸氯丙嗪处理后, hCMEC/D3 细胞对 GEVs/DiO 的摄取量与对照组相



A-体外 BBB 模型示意图; B-PC12 细胞中 DiO 的荧光强度; C-hCMEC/D3 细胞中 DiO 的荧光强度; 与对照组比较: * $P < 0.05$ *** $P < 0.001$ 。
A-schematic diagram of *in vitro* BBB model; B-fluorescence intensity of DiO in PC12 cells; C-fluorescence intensity of DiO in hCMEC/D3 cells;
* $P < 0.05$ *** $P < 0.001$ vs control group.

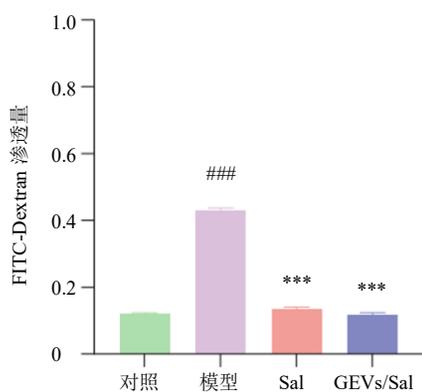
图 8 GEVs/Sal 的体外 BBB 穿透能力考察结果 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 8 Results of *in vitro* BBB penetration ability assessment of GEVs/Sal ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

比没有明显变化。表明 hCMEC/D3 细胞对 GEVs/DiO 的内化过程是网格蛋白和巨胞饮作用介导的。

3.8 GEVs/Sal 对 BBB 通透性改善作用考察

采用 FITC-Dextran 检测 GEVs/Sal 对 OGD/R 损伤后 BBB 通透性的影响。结果如图 9 所示, 与对照组比较, 模型组 FITC-Dextran 渗透量明显增加 ($P < 0.001$); 而 Sal 组和 GEVs/Sal 则降低了 FITC-Dextran 的渗透量 ($P < 0.001$), 表明 GEVs/Sal 能够显著改善 BBB 的通透性。



与对照组比较: ### $P < 0.001$; 与模型组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$, 下同。
$P < 0.001$ vs control group; * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$ vs model group, same as below figures.

图 9 FITC-Dextran 渗透性检测 GEVs/Sal 对 BBB 通透性的改善作用 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 9 FITC-Dextran permeability assay for improvement of BBB permeability by GEVs/Sal ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

3.9 GEVs/Sal 对线粒体功能保护作用考察

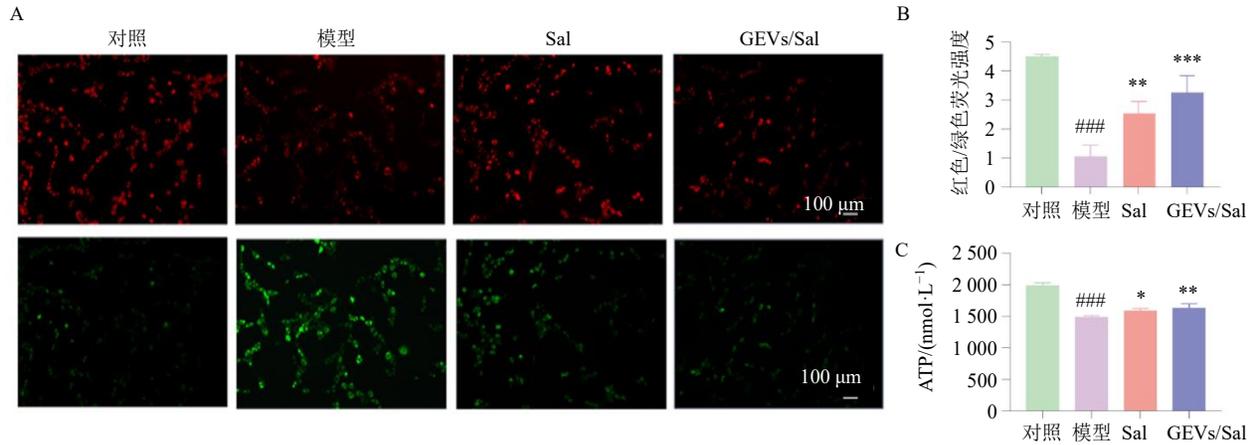
通过 JC-1 荧光染色法检测 GEVs/Sal 对 OGD/R 处理的 PC12 细胞线粒体功能的影响。如图 10-A、B 所示, 与模型组比较, GEVs/Sal 组细胞的线粒体膜电位明显恢复 ($P < 0.001$), 表明该复合物能有效维持线粒体功能完整性。通过 ELISA 测定细胞内 ATP 水平, 如图 10-C 所示, GEVs/Sal 组细胞内 ATP 水平显著升高 ($P < 0.01$), 提示 GEVs/Sal 具有保护线粒体结构和功能的作用。

3.10 GEVs/Sal 改善神经元细胞凋亡作用考察

如图 11 所示, 与对照组比较, 模型组 Bax 和 Caspase-3 表达显著增加 ($P < 0.001$), Bcl-2 表达显著降低 ($P < 0.001$), 说明 PC12 细胞 OGD/R 造模成功, 并诱导了细胞凋亡; 经 Sal 和 GEVs/Sal 处理后, Bax 和 Caspase-3 表达显著降低 ($P < 0.01$ 、 0.001), GEVs/Sal 组 Bcl-2 表达显著升高 ($P < 0.001$), 表明二者均具有神经保护作用。GEVs/Sal 组的治疗效果优于 Sal 单独处理组, 可能与 GEVs 促进药物递送或缓释效应有关。

3.11 GEVs/Sal 体外抗氧化应激、抗炎作用考察

为验证 GEVs/Sa 的 ROS 清除作用, 采用 DCFH-DA 活细胞探针针对细胞内的 ROS 水平进行检测。结果如图 12-A、B 所示, 与对照组比较, OGD/R 诱导的 PC12 细胞中 ROS 绿色荧光强度明显增强 ($P < 0.001$), 使用 Sal 或 GEVs/Sal 处理后能够显著降低 PC12 细胞内 ROS 水平 ($P < 0.05$ 、 0.001)。采用试剂盒检测细胞内氧化应激相关指标, 如图 12-C~E



A-JC-1 荧光染色的代表性图像 (×10); B-JC-1 聚集体 (红色)/JC-1 单体 (绿色) 的荧光比值; C-ELISA 法检测不同药物干预后 PC12 细胞内 ATP 水平。

A-representative images of JC-1 fluorescence staining in PC12 cells (× 10); B-JC-1 aggregates (red)/JC-1 monomer (green) fluorescence ratio was analyzed to indicate mitochondrial membrane potential; C-detection of ATP level in PC12 cells after different drug intervention by ELISA.

图 10 GEVs/Sal 对线粒体功能的保护作用 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 10 Protective effects of GEVs/Sal on mitochondrial function ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

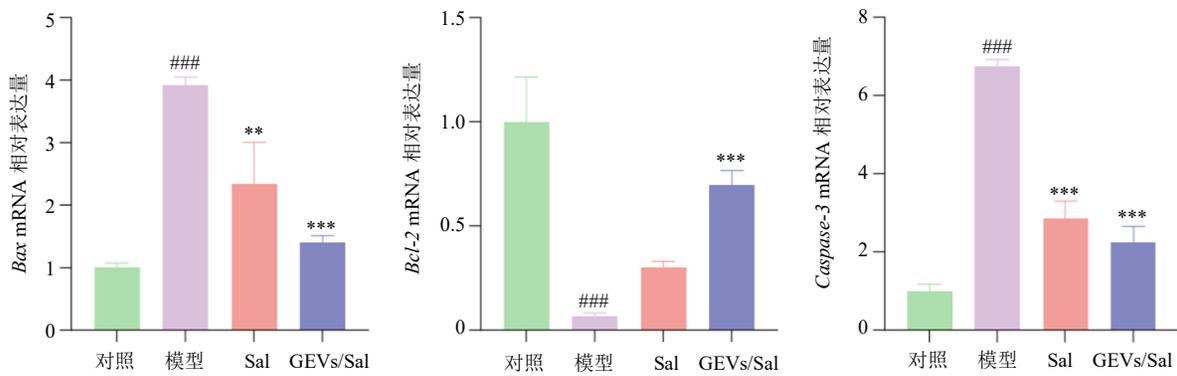


图 11 各组细胞 Bax、Bcl-2 和 Caspase-3 mRNA 表达 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 11 Bax, Bcl-2 and Caspase-3 mRNA expressions in cells of all groups ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

所示,与模型组比较,Sal 组和 GEVs/Sal 组细胞氧化损伤标志物 MDA 水平明显下降 ($P < 0.05, 0.001$),抗氧化酶 GSH-Px 和 SOD 活性显著升高 ($P < 0.05, 0.001$)。这一结果证实 GEVs/Sal 能有效增强细胞抗氧化应激功能。采用试剂盒检测炎症因子水平,如图 13 所示,与模型组比较,Sal 或 GEVs/Sal 组 TNF- α 、IL-6 和 IL-1 β 水平均显著降低 ($P < 0.05, 0.01, 0.001$),表明 GEVs/Sal 具有较好的抗炎能力。

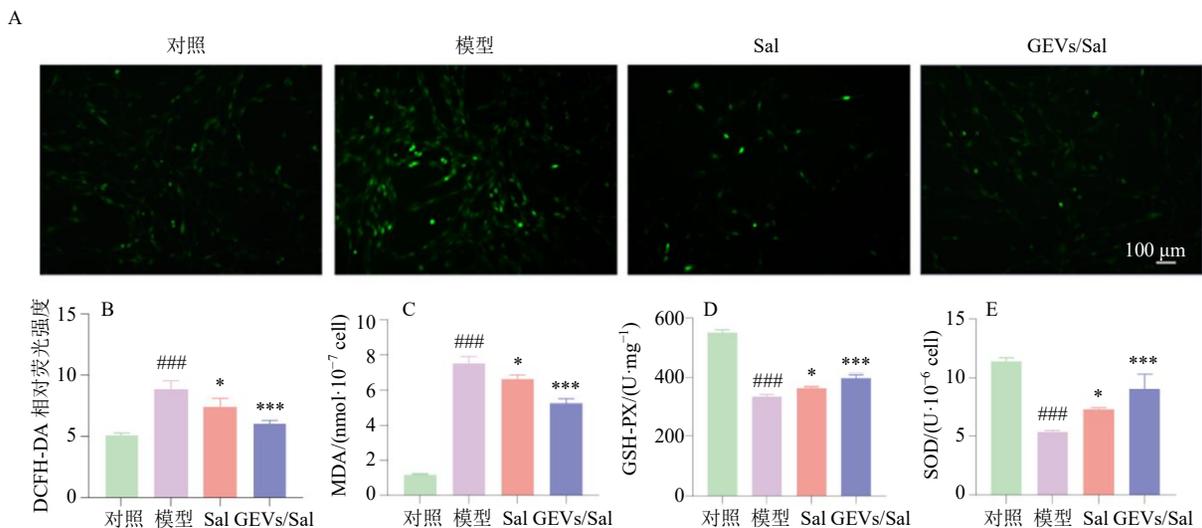
3.12 GEVs/Sal 调节小胶质细胞极化作用考察

为验证 GEVs/Sal 对 BV2 细胞的极化调节作用,采用免疫荧光法对小胶质细胞极化标志物 Arg-1 和 iNOS 进行表征。结果如图 14 所示,LPS 诱导可促使 BV2 细胞朝向 M1 促炎型极化,表达 iNOS 极化标志物,LPS 组 iNOS 红色荧光显著增加 ($P < 0.001$),说明模型诱导成功;经 Sal 或 GEVs/Sal 干

预后,iNOS 红色荧光降低 ($P < 0.05, 0.01$),GEVs/Sal 组 Arg-1 绿色荧光增加 ($P < 0.05$),说明给药后能够促进 BV2 细胞向 M2 抗炎型极化,是 GEVs/Sal 发挥脑缺血治疗作用的重要机制之一。

4 讨论

IS 作为脑组织损伤的一种急性脑血管疾病,受治疗时间窗口短以及 IRI 严重的影响,现有神经保护治疗方案效果有限。以依达拉奉为代表的传统神经保护药物在临床应用中普遍伴有较为严重的不良反应以及难以应对 IS 涉及的多重病理生理学改变,导致整体治疗效果受限。本课题组通过使用 GEVs 作为药物载体,解决了多靶点药物 Sal 的 BBB 穿透能力有限的问题,成功建立仿生纳米药物递送平台 GEVs/Sal。此外,GEVs 的特征成分 NAR 有望协同增强对 IS 及 IRI 的治疗效果。制剂表征实验



A、B-采用 DCFH-DA 探针检测不同药物干预后 PC12 细胞内 ROS 水平 (×10); C-MDA 水平; D-GSH-Px 活性; E-SOD 活性。
A, B-detection of ROS level in PC12 cells after different drug intervention using DCFH-DA probe (× 10); C-level of MDA; D-activity of GSH-Px; E-activity of SOD.

图 12 GEVs/Sal 的抗氧化应激能力评价 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 12 Evaluation of antioxidant stress ability of GEVs/Sal ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

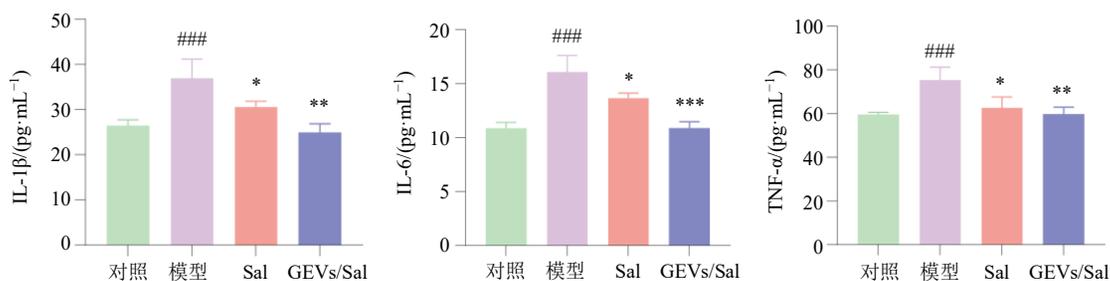
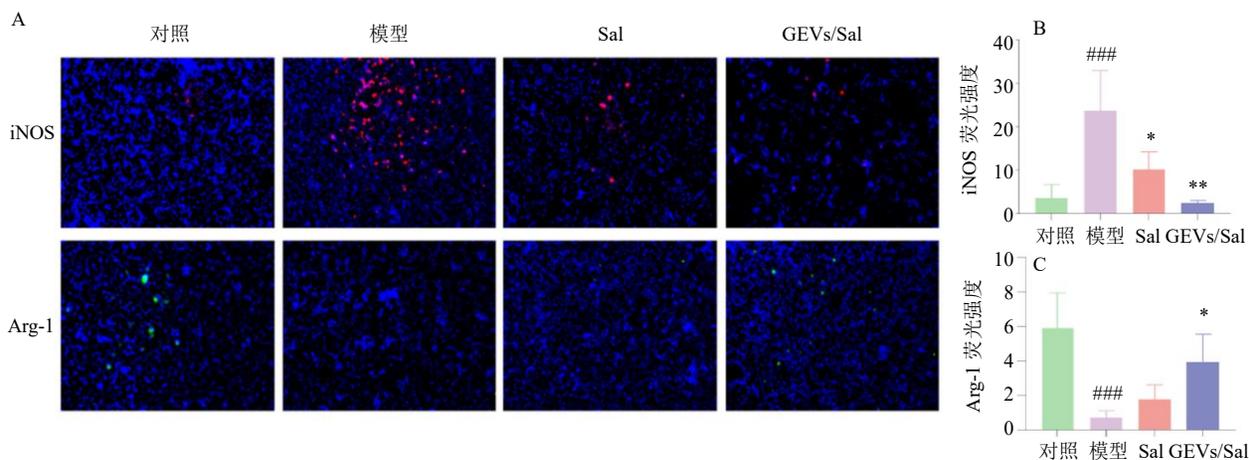


图 13 GEVs/Sal 的抗炎能力评价 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 13 Evaluation of anti-inflammatory ability of GEVs/Sal ($\bar{x} \pm s, n = 3$)



A-iNOS 和 Arg-1 荧光染色的代表性图像 (×10); B-iNOS 的荧光强度; C-Arg-1 的荧光强度。

A-representative images of fluorescent staining for iNOS and Arg-1 (× 10); B-fluorescence intensity of iNOS; C-fluorescence intensity of Arg-1.

图 14 GEVs/Sal 对小胶质细胞的极化调节作用 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 14 Polarization regulation effect of GEVs/Sal on microglia ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

发现, GEVs 粒径均一, 表达 CD81、CD9 特征性膜蛋白以及成功荷载了 Sal。体外药效学结果表明, GEVs/Sal 对 PC12 细胞无明显细胞毒性, 能够极大地改善 OGD/R 损伤后的 PC12 细胞活力。体外 BBB 模型实验明确验证了 GEVs/Sal 显著增强 BBB 穿透能力, 这是实现脑部靶向递送的关键基础。同时, GEVs/Sal 有效保护了 BBB 完整性, 逆转线粒体膜电位, 升高细胞内 ATP 含量, 有助于减轻线粒体结构损伤, 并降低 OGD/R 诱导的细胞凋亡。因此, GEVs/Sal 被证明能在一定程度上保护受损伤的 PC12 细胞, 提供针对 IRI 的神经保护策略。此外, GEVs/Sal 也可促进 BV2 细胞向 M2 抗炎极化, 可能是其发挥抗炎作用的机制。本研究成功构建了 GEVs/Sal 仿生纳米递药系统治疗 IRI, 为克服 IS 治疗中药物递送障碍提供新策略。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Tu W J, Wang L D, Yan F, *et al.* China stroke surveillance report 2021 [J]. *Mil Med Res*, 2023, 10(1): 33.
- [2] Campbell B C V, Khatri P. Stroke [J]. *Lancet*, 2020, 396(10244): 129-142.
- [3] Mendelson S J, Prabhakaran S. Diagnosis and management of transient ischemic attack and acute ischemic stroke: A review [J]. *JAMA*, 2021, 325(11): 1088-1098.
- [4] Heck D, Jost A. Carotid stenosis, stroke, and carotid artery revascularization [J]. *Prog Cardiovasc Dis*, 2021, 65: 49-54.
- [5] Mathias K, Machado R S, Stork S, *et al.* Blood-brain barrier permeability in the ischemic stroke: An update [J]. *Microvasc Res*, 2024, 151: 104621.
- [6] Li S Y, Wang Y, Wu M J, *et al.* Spleen-targeted glabridin-loaded nanoparticles regulate polarization of monocyte/macrophage (m_0/m_ϕ) for the treatment of cerebral ischemia-reperfusion injury [J]. *Adv Mater*, 2022, 34(39): e2204976.
- [7] Zhang M, Liu Q, Meng H, *et al.* Ischemia-reperfusion injury: Molecular mechanisms and therapeutic targets [J]. *Signal Transduct Target Ther*, 2024, 9(1): 12.
- [8] Lan X B, Wang Q, Liu Y, *et al.* Isoliquiritigenin alleviates cerebral ischemia-reperfusion injury by reducing oxidative stress and ameliorating mitochondrial dysfunction via activating the Nrf2 pathway [J]. *Redox Biol*, 2024, 77: 103406.
- [9] Zhu T, Wang L, Wang L P, *et al.* Therapeutic targets of neuroprotection and neurorestoration in ischemic stroke: Applications for natural compounds from medicinal herbs [J]. *Biomed Pharmacother*, 2022, 148: 112719.
- [10] Fan F F, Yang L, Li R, *et al.* Salidroside as a potential neuroprotective agent for ischemic stroke: A review of sources, pharmacokinetics, mechanism and safety [J]. *Biomed Pharmacother*, 2020, 129: 110458.
- [11] Lai W F, He Y F, Zhou B B, *et al.* Salidroside facilitates neuroprotective effects in ischemic stroke by promoting axonal sprouting through promoting autophagy [J]. *Phytomedicine*, 2024, 135: 156208.
- [12] Zheng J B, Zhang J Z, Han J, *et al.* The effect of salidroside in promoting endogenous neural regeneration after cerebral ischemia/reperfusion involves Notch signaling pathway and neurotrophic factors [J]. *BMC Complement Med Ther*, 2024, 24(1): 293.
- [13] 蔡静, 黄文静, 刘时喜, 等. 基于 TGF- β 1/Smad3 信号探讨红景天苷对缺血性脑卒中大鼠的神经保护作用机制 [J]. *中草药*, 2020, 51(24): 6294-6301.
- [14] Pu W L, Zhang M Y, Bai R Y, *et al.* Anti-inflammatory effects of *Rhodiola rosea* L.: A review [J]. *Biomed Pharmacother*, 2020, 121: 109552.
- [15] Liang C X, Qi D L, Zhang L N, *et al.* Preparation and evaluation of a water-in-oil nanoemulsion drug delivery system loaded with salidroside [J]. *Chin J Nat Med*, 2021, 19(3): 231-240.
- [16] Long Y, Yang Q Y, Xiang Y, *et al.* Nose to brain drug delivery-A promising strategy for active components from herbal medicine for treating cerebral ischemia reperfusion [J]. *Pharmacol Res*, 2020, 159: 104795.
- [17] Chen W, Jiang L F, Hu Y Q, *et al.* Nanomedicines, an emerging therapeutic regimen for treatment of ischemic cerebral stroke: A review [J]. *J Control Release*, 2021, 340: 342-360.
- [18] Kanthi Y, de la Zerda A, Smith B R. Nanotherapeutic shots through the heart of plaque [J]. *ACS Nano*, 2020, 14(2): 1236-1242.
- [19] Zhang C Y, Zhu W J, Meng Q H, *et al.* Halotherapy relieves chronic obstructive pulmonary disease by alleviating NLRP3 inflammasome-mediated pyroptosis [J]. *Ann Transl Med*, 2022, 10(23): 1279.
- [20] Satapathy M K, Yen T L, Jan J S, *et al.* Solid lipid nanoparticles (SLNs): An advanced drug delivery system targeting brain through BBB [J]. *Pharmaceutics*, 2021, 13(8): 1183.
- [21] 中国研究型医院学会细胞外囊泡研究与应用专业委员会, 中草药囊泡研究与应用专家委员会, 中草药囊泡广东省工程研究中心, 广东省中医药学会中草药囊泡研究与应用专业委员会, 等. 中草药囊泡研究与应用专家共识 (2023 年版) [J]. *中草药*, 2024, 55(1): 12-22.

- [22] Niu W B, Xiao Q, Wang X J, *et al.* A biomimetic drug delivery system by integrating grapefruit extracellular vesicles and doxorubicin-loaded heparin-based nanoparticles for glioma therapy [J]. *Nano Lett*, 2021, 21(3): 1484-1492.
- [23] Adetunji J A, Fasae K D, Awe A I, *et al.* The protective roles of *Citrus* flavonoids, naringenin, and naringin on endothelial cell dysfunction in diseases [J]. *Heliyon*, 2023, 9(6): e17166.
- [24] Chen H S, He Y C, Chen S, *et al.* Therapeutic targets of oxidative/nitrosative stress and neuroinflammation in ischemic stroke: Applications for natural product efficacy with omics and systemic biology [J]. *Pharmacol Res*, 2020, 158: 104877.
- [25] Xi Y, Chi Z C, Tao X F, *et al.* Naringin against doxorubicin-induced hepatotoxicity in mice through reducing oxidative stress, inflammation, and apoptosis via the up-regulation of SIRT1 [J]. *Environ Toxicol*, 2023, 38(5): 1153-1161.
- [26] Salunkhe S, Dheeraj, Basak M, *et al.* Surface functionalization of exosomes for target-specific delivery and *in vivo* imaging & tracking: Strategies and significance [J]. *J Contr Rel*, 2020, 326: 599-614.
- [27] Rayamajhi S, Nguyen T D T, Marasini R, *et al.* Macrophage-derived exosome-mimetic hybrid vesicles for tumor targeted drug delivery [J]. *Acta Biomater*, 2019, 94: 482-494.

[责任编辑 李亚楠]