

负载毛蕊异黄酮的叶酸修饰膜荚黄芪外泌体样纳米颗粒的制备及体外抑制巨噬细胞极化作用评价

李秀英, 张峰源, 王鑫, 刘彩霞, 杨丽霞, 李钦青*, 闫志芳*

山西中医药大学, 山西 晋中 030619

摘要: 目的 制备负载毛蕊异黄酮 (calycosin, Cal) 的叶酸 (folic acid, FA) 修饰膜荚黄芪 *Astragalus membranaceus* 外泌体样纳米颗粒 (FA-Exos@Cal), 并考察其在体外对巨噬细胞 M1 极化抑制作用。方法 采用差速离心结合蔗糖密度梯度离心法提取黄芪外泌体样纳米颗粒 (exosome-like vesicles, Exos); 通过薄膜分散-孵育法制备 FA-Exos@Cal; 利用透射电子显微镜 (transmission electron microscopy, TEM)、二辛可宁酸法 (bicinchoninic acid, BCA)、十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE)、动态光散射 (dynamic light scattering, DLS)、HPLC 法及透析袋法, 表征颗粒形态、蛋白特征、粒径、 ζ 电位、载药特性及体外释放行为; 采用荧光显微和流式细胞技术评价其对 M1 型 RAW264.7 细胞的靶向性; 采用细胞计数试剂盒-8 (cell counting kit-8, CCK-8) 法检测其对巨噬细胞增殖抑制作用, 采用流式细胞技术考察其对 M1 标志物 CD86 表达水平的影响, 通过酶联免疫吸附试验 (enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA) 等测定炎症相关因子白细胞介素-1 β (interleukin-1 β , IL-1 β)、肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)、IL-6、一氧化氮 (nitric oxide, NO) 的表达水平。结果 成功制备 FA-Exos@Cal, 其呈典型囊泡样结构, 蛋白质量浓度、粒径、 ζ 电位、载药量、包封率分别为 (3.52 \pm 0.26) mg/mL、(127.4 \pm 2.6) nm、(-11.14 \pm 0.30) mV、(12.14 \pm 0.18) %、(27.21 \pm 1.04) %, 修饰前后蛋白特征无明显差异, 药物体外缓释效果良好。叶酸修饰能显著提升 M1 型巨噬细胞对 FA-Exos@Cal 颗粒的摄取效率, 并降低毛蕊异黄酮对巨噬细胞的毒性; FA-Exos@Cal 可显著降低 M1 型巨噬细胞 CD86 阳性率, 并显著下调 IL-1 β 、TNF- α 、IL-6 及 NO 的表达水平; 与 Exos、毛蕊异黄酮及 Exos&Cal 物理混合物的对比分析显示, Exos 与毛蕊异黄酮联用具有协同增效效应。结论 成功制备工程化靶向修饰的仿生纳米递送系统 FA-Exos@Cal, 证实其具备优异的 M1 型巨噬细胞靶向性, 可有效抑制 M1 极化及炎症因子释放, 有望为炎症性疾病治疗提供新策略。

关键词: 毛蕊异黄酮; 黄芪外泌体样纳米颗粒; 叶酸受体靶向; 巨噬细胞 M1 极化; 抗炎

中图分类号: R283.6 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2026)08-3042-09

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2026.08.017

Preparation of calycosin-loaded folate-modified *Astragalus membranaceus* exosome-like nanoparticles and *in vitro* evaluation of inhibitory effect on macrophage M1 polarization

LI Xiuying, ZHANG Fengyuan, WANG Xin, LIU Caixia, YANG Lixia, LI Qinqing, YAN Zhifang
Shanxi University of Chinese Medicine, Jinzhong 030619, China

Abstract: Objective To prepare folic acid (FA)-modified Mojiahuangqi (*Astragalus membranaceus*, AM) exosome-like nanoparticles loaded with calycosin (Cal) (FA-Exos@Cal) and investigate their inhibitory effect on M1 polarization of macrophages *in vitro*. **Methods** AM exosome-like nanoparticles (Exos) were isolated by differential centrifugation combined with sucrose density gradient centrifugation. FA-Exos@Cal was prepared by the thin-film dispersion-incubation method. Transmission electron microscopy (TEM), bicinchoninic acid (BCA) assay, sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE), dynamic light scattering, HPLC, and dialysis bag method were used to characterize the particle morphology, protein properties, particle size, ζ

收稿日期: 2025-11-04

基金项目: 国家自然科学基金青年科学基金项目 (81903813); 山西省基础研究计划项目 (202303021211171); 山西省中医药管理局资助项目 (2022ZYC087); 山西中医药大学科技创新项目 (2024PY-NS-009); 山西中医药大学科技创新项目 (2022PY-TH-12)

作者简介: 李秀英, 副教授, 研究方向为中药制剂新技术与新剂型。E-mail: lixiuying85@163.com

*通信作者: 闫志芳, 高级实验师, 研究方向为中药制剂技术。E-mail: yanzhifang@sxtcm.edu.cn

李钦青, 副教授, 研究方向为中药物质基础及大健康产品研究。E-mail: Liqq@sxtcm.edu.cn

potential, drug-loading characteristics, and *in vitro* release behavior. Fluorescence microscopy and flow cytometry were employed to evaluate the targeting ability of FA-Exos@Cal to M1-type RAW264.7 cells. Cell counting kit-8 (CCK-8) assay was used to detect the effect of FA-Exos@Cal on macrophage proliferation. Flow cytometry was applied to investigate its influence on the expression level of M1 marker CD86. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and other methods were used to determine the expression levels of inflammatory factors including interleukin-1 β (IL-1 β), tumor necrosis factor- α (TNF- α), IL-6, and nitric oxide (NO). **Results** FA-Exos@Cal was successfully prepared. TEM showed a typical vesicular structure. The protein concentration, particle size, ζ potential, drug loading capacity, and entrapment efficiency were (3.52 \pm 0.26) mg/mL, (127.4 \pm 2.6) nm, (-11.14 \pm 0.30) mV, (12.14 \pm 0.18)%, and (27.21 \pm 1.04)%, respectively. There was no significant difference in protein properties before and after modification, and the drug exhibited good sustained-release effect *in vitro*. FA modification significantly enhanced the cellular uptake efficiency of FA-Exos by M1-polarized macrophages while reducing the cytotoxicity of Cal toward macrophages. Moreover, FA-Exos@Cal could significantly reduce the CD86-positive rate of M1-type macrophages and down-regulate the expression levels of IL-1 β , TNF- α , IL-6, and NO. Comparative analysis with Exos, Cal, and the physical mixture of Exos and Cal revealed that the combined use of Exos and Cal exerted a synergistic effect. **Conclusion** FA-Exos@Cal, an engineered targeted biomimetic nano-delivery system, was successfully prepared. It was confirmed to have excellent targeting ability to M1-type macrophages, and could effectively inhibit M1 polarization and the release of inflammatory factors, which is expected to provide a new strategy for the treatment of inflammatory diseases.

Key words: calycosin; *Astragalus membranaceus* exosome-like nanoparticles; folate receptor-mediated targeting; macrophage M1 polarization; anti-inflammation

炎症是机体应对损伤或感染的保护性反应，但持续性慢性炎症是类风湿性关节炎、糖尿病肾病、炎症性肠病等多种疾病的核心病理基础，其发生发展与巨噬细胞的异常活化及表型极化密切相关^[1]。巨噬细胞作为天然免疫系统的核心细胞，具有高度功能可塑性，主要分为促炎表型（M1型）和抗炎表型（M2型）。M1型巨噬细胞可通过分泌白细胞介素-1 β （interleukin-1 β , IL-1 β ）、肿瘤坏死因子- α （tumor necrosis factor- α , TNF- α ）等促炎因子及表达诱导型一氧化氮合酶加剧炎症反应，而M2型巨噬细胞则通过分泌抗炎因子促进组织修复^[2-3]。因此，靶向抑制巨噬细胞向M1型极化，调控炎症微环境平衡，已成为炎症性疾病治疗的关键靶点。

近年来，天然活性成分因其多靶点抗炎特性受到广泛关注，其中毛蕊异黄酮（calycosin, Cal）作为黄芪的核心活性黄酮类成分，被证实具有显著的抗炎、抗氧化及免疫调节作用^[4-5]，可通过抑制核因子- κ B（nuclear factor- κ B, NF- κ B）、c-Jun 氨基末端激酶（c-Jun N-terminal kinase, JNK）等炎症通路，降低脂多糖诱导的巨噬细胞炎症因子释放，减轻脏器炎性损伤^[6-8]。然而，毛蕊异黄酮的临床转化面临2大关键瓶颈：其一，其分子结构中富含疏水基团，水溶性极差；其二，缺乏组织靶向性，药物在非病变部位的广泛分布不仅降低疗效，还可能引发潜在毒副作用^[9]。

为解决天然药物递送难题，纳米载体系统成为研究热点，其中脂质体、聚合物纳米粒等人工合成

载体虽能改善药物溶解度，但存在生物相容性差、易被网状内皮系统清除等问题^[10-11]。相比之下，植物来源外泌体样纳米颗粒（exosome-like vesicles, Exos）作为天然膜性囊泡，以脂质双分子层为骨架，兼具纳米级粒径、优异的生物安全性及跨生物膜能力，且其表面富含的蛋白、糖脂等活性成分可赋予靶向特性，已成为新一代仿生递送载体^[12-13]。黄芪作为中医“扶正固本”的经典药材，其提取物在炎症调控中应用历史悠久，现代研究证实黄芪来源Exos不仅可作为药物载体，其自身还能与负载药物产生协同作用，可发挥抗炎作用^[14]。但现有研究多聚焦于黄芪Exos的基础抗炎活性，尚未将其作为靶向载体用于炎症部位的精准药物递送，且缺乏针对M1型巨噬细胞的主动靶向修饰设计。

值得注意的是，M1型巨噬细胞表面叶酸受体表达水平较正常细胞及M2型巨噬细胞显著升高，这为主动靶向递送提供了特异性靶点^[15]。叶酸作为叶酸受体的天然配体，具有相对分子质量小、稳定性高、与叶酸受体亲和力强等优势，已被广泛用于肿瘤、炎症等疾病的靶向载体修饰^[16-17]。目前，尚未见将叶酸修饰的黄芪Exos作为载体负载毛蕊异黄酮，实现M1型巨噬细胞靶向递送的相关报道。基于此，本研究提出“天然载体-主动靶向-药物协同”的设计思路：采用差速离心结合蔗糖密度梯度离心法提取黄芪Exos，利用其天然生物相容性与抗炎活性构建载体基础；通过薄膜分散-孵育法对Exos进行叶酸修饰并负载毛蕊异黄酮，构建靶向

M1 型巨噬细胞的负载毛蕊异黄酮叶酸修饰膜荚黄芪外泌体样纳米颗粒 (folic acid-modified *Astragalus membranaceus* exosome-like nanoparticles loaded with calycosin, FA-Exos@Cal); 从理化表征、靶向性、细胞安全性及抗炎活性 4 个维度, 系统评价该递送系统的性能。

1 仪器与材料

1.1 仪器

JYL-Y96 型榨汁机, 九阳股份有限公司; 1011 型透射电子显微镜, 日本 JEOL 公司; Zetasizer Nano ZS 型马尔文激光粒径仪, 英国 Malvern Panalytical 公司; CytoFLEX S 型流式细胞仪、Optima XE-90 型超速离心机, 美国 Beckman 公司; N-1300 型旋转蒸发仪, 上海爱朗仪器有限公司; SPectra Max i3x 型酶标仪, 美国 Molecular Devices 公司; DM4000 型荧光显微镜, 德国 Leica 公司; 1260 型高效液相色谱仪, 美国 Agilent 公司。

1.2 药品与试剂

DMEM 高糖培养基, 批号 6125118, 购自美国 Gibco 公司; 青霉素-链霉素 (批号 MA0110-May-15K)、CCK-8 试剂盒 (批号 MA0218-2), 购自大连美仑生物科技有限公司; 胎牛血清, 批号 20230721, 购自赛澳美细胞技术 (北京) 有限公司; 脂多糖, 批号 34231201021, 购自北京索莱宝科技有限公司; γ 干扰素 (interferon- γ , IFN- γ), 批号 412543, 购自美国 Med Chem Express 公司; 毛蕊异黄酮对照品, 批号 MUST-23101123, 质量分数 $\geq 98.0\%$, 购自曼斯特 (成都) 生物科技有限公司; DSPE-PEG-FA, 批号 R2M0230530, 购自西安瑞禧生物科技有限公司; 香豆素-6 (coumarin-6, C6), 批号 C15361626, 购自上海麦克林生化科技股份有限公司; IL-1 β ELISA 试剂盒 (批号 Sep2023)、TNF- α ELISA 试剂盒 (批号 202412)、IL-6 ELISA 试剂盒 (批号 202412), 购自上海科兴商贸有限公司; RIPA 裂解液, 批号 17H02A02, 购自武汉博士德生物工程有限公司; 一氧化氮 (nitric oxide, NO) 检测试剂盒 (批号 112223240529)、BCA 蛋白定量试剂盒 (批号 A381250625), 购自上海碧云天生物技术有限公司; PE-CD86 抗体, 批号 S02008765, 购自美国 Biolegend 公司; 再生纤维素透析袋, 截留相对分子质量 5 000, 购自上海源叶生物科技有限公司。

1.3 药材

鲜膜荚黄芪购于安国药材市场, 经山西中医药

大学李钦青教授鉴定, 为豆科黄芪属植物膜荚黄芪 *Astragalus membranaceus* (Fisch.) Bge. 的新鲜根茎。

1.4 细胞

RAW264.7 小鼠巨噬细胞, 货号 CL-0190, 购自武汉普诺赛生命科技有限公司。

2 方法与结果

2.1 膜荚黄芪来源 Exos 及 FA-Exos@Cal 的制备与表征

2.1.1 Exos 的制备 参照文献报道, 本研究采用机械破碎法进行鲜药材处理, 随后通过差速离心提取囊泡并用蔗糖密度梯度法进行纯化^[17] (图 1)。取鲜膜荚黄芪 500 g, 洗净后切小块, 加入 2 倍体积磷酸盐缓冲液 (PBS), 破壁机匀浆后转移至 50 mL 离心管中, 4 °C 下依次 1 000 \times g 离心 10 min、3 000 \times g 离心 15 min、10 000 \times g 离心 40 min, 收集上清, 经 0.22 μ m 滤膜滤过后, 于 4 °C、150 000 \times g 条件下离心 90 min, 弃上清, 沉淀用 2 mL 的 PBS 重悬, 将重悬液缓慢铺于 15%、30%、45%、60% 蔗糖密度梯度上层, 150 000 \times g、4 °C 离心 2 h, 收集含 Exos 蔗糖区带, PBS 稀释后再次 150 000 \times g 离心 90 min, 沉淀用适量 PBS 重悬, -80 °C 保存备用。

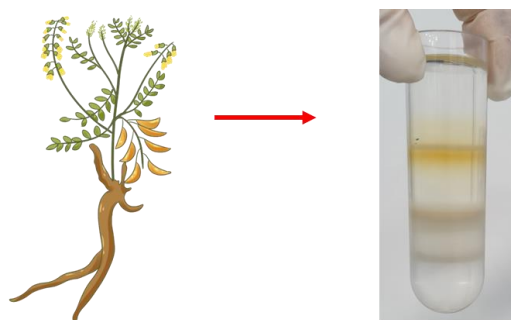


图 1 Exos 的蔗糖密度梯度纯化

Fig. 1 Purification of Exos by sucrose density gradient

2.1.2 FA-Exos@Cal 的制备 采用薄膜分散-孵育法进行靶向性修饰及载药。取 DSPE-PEG-FA 50 μ g、毛蕊异黄酮 250 μ g 溶于甲醇, 置于茄形瓶中旋转蒸发成薄膜, 加入 Exos 悬液 (1 mg/mL) 1 mL, 37 °C 孵育 2 h, 0.22 μ m 滤膜滤过, 去除未溶解毛蕊异黄酮, 在 4 °C、4 000 \times g 下通过截留相对分子质量 1.00×10^5 超滤管离心 15 min, 弃下管液体, 内管加入 PBS 反复重悬洗涤 3 次, 获得 FA-Exos@Cal; 同法制备未修饰载药外泌体 (Exos@Cal) 及荧光探针载体 (Exos@C6、FA-Exos@C6)。

2.1.3 FA-Exos@Cal 的外观形态观察 取 Exos、FA-Exos@Cal 悬液用超纯水稀释至适宜浓度, 滴加

于碳覆膜铜网上,静置 5 min,2%磷钨酸负染 5 min,滤纸吸干后室温晾干,在透射电子显微镜(transmission electron microscopy, TEM)下观察形态,Exos 与 FA-Exos@Cal 均呈典型的杯状或球形囊泡结构,膜边界清晰(图 2)。

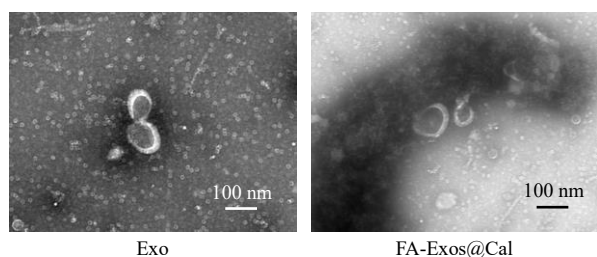


图 2 Exo 和 FA-Exos@Cal 的 TEM 图

Fig. 2 TEM images of Exos and FA-Exos@Cal

2.1.4 FA-Exos@Cal 的蛋白质量浓度及成分分析 取适量 Exos、FA-Exos@Cal 加入等体积裂解液,冰上裂解 30 min 提取总蛋白,BCA 法测定 Exos 及 FA-Exos@Cal 的蛋白质量浓度分别为 (3.56±0.10)、(3.52±0.26)mg/mL,两者间无显著差异。进行 SDS-PAGE 电泳,分析其蛋白组成,结果如图 3 所示,Exos 及 FA-Exos@Cal 的蛋白组成一致,表明 Exos 经靶向修饰及载药后,依然保留 Exos 的特异性蛋白组成。

2.1.5 FA-Exos@Cal 的一般指标测定 Exos 与 FA-Exos@Cal 悬液用超纯水稀释 10 倍,0.22 μm 滤膜滤过后,激光粒度仪测定粒径分布及 ζ 电位,Exos@

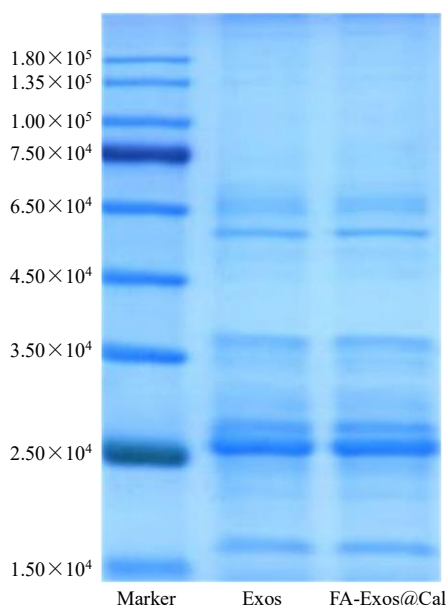


图 3 Exos 及 FA-Exos@Cal 的 SDS-PAGE 电泳图谱

Fig. 3 SDS-PAGE gel electrophoresis images of Exos and FA-Exos@Cal

Cal 的平均粒径及 ζ 电位分别为 (120.8±2.5) nm、(-9.89±0.33) mV,经叶酸修饰后,平均粒径及 ζ 电位分别变为 (127.4±2.6) nm、(-11.14±0.30) mV,说明叶酸修饰成功。

采用 HPLC 法测定载药量与包封率。色谱条件:InertSustain C₁₈ 柱 (150 mm×4.6 mm, 5 μm); 以乙腈-0.2%甲酸水溶液 (35:65) 为流动相,1.0 mL/min 的体积流量进行等度洗脱;柱温 30 °C;检测波长 260 nm;进样量 10 μL。由表 1 可知,Exos@Cal 的载药量与包封率分别为 (11.86±0.21)%、(27.34±1.56)%,FA-Exos@Cal 的载药量与包封率分别为 (12.14±0.18)%、(27.21±1.04)%,两者无显著差异,且能满足药物递送需求。

载药量 = 制剂中毛蕊异黄酮质量 / (制剂中毛蕊异黄酮质量 + 总蛋白质量)

包封率 = 制剂中毛蕊异黄酮质量 / 投药量

表 1 Exos@Cal 及 FA-Exos@Cal 的粒径、ζ 电位、包封率与载药量 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 1 Size, ζ potential, entrapment efficiency and drug loading capacity of Exos@Cal and FA-Exos@Cal ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

制剂	粒径/nm	ζ 电位/mV	载药量/%	包封率/%
Exos@Cal	120.8±2.5	-9.89±0.33	11.86±0.21	27.34±1.56
FA-Exos@Cal	127.4±2.6	-11.14±0.30	12.14±0.18	27.21±1.04

2.1.6 FA-Exos@Cal 的体外释药性能考察 取 1 mL Exos@Cal 和 FA-Exos@Cal,分别加入到透析袋(截留相对分子质量为 5 000),并放置于 20 mL 含有 10%胎牛血清的 PBS 溶液 (pH 7.0) 中,恒温摇床震荡 (37 °C, 70 r/min),分别在 0、2、6、12、24、48、72 h 时,收集释放介质同时补充等体积溶液,HPLC 法测定释放的药物量,计算药物体外累积释放率。累积释放率考察结果如图 4 所示,Exos@Cal 及 FA-Exos@Cal 的 2 h 体外累积释放率分别为 (19.83±2.04)%、(17.34±2.54)%,均低于 20%,说明制剂的突释性较低;同时,72 h 累积释放率分别为 (70.05±7.54)%、(60.48±4.58)%,说明二者均具有较好的缓释性能,为炎症性疾病的长期治疗提供条件。

体外累积释放率 = 不同时间点释放到介质中的药物总量 / 制剂中毛蕊异黄酮的总量

2.2 FA-Exos 对 M1 型巨噬细胞的靶向性评价

以香豆素-6 为荧光探针对 Exos、FA-Exos 及同粒径的叶酸修饰的脂质体 (FA-Lipo, 实验室自制)

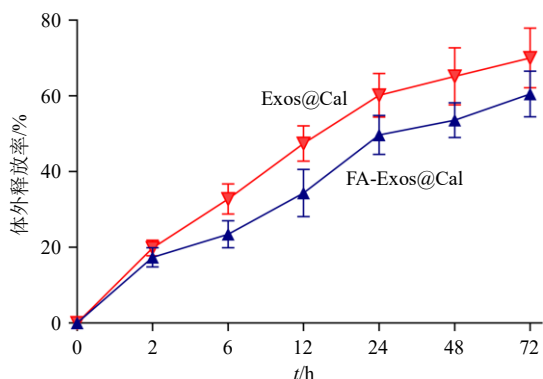


图4 Exos@Cal 及 FA-Exos@Cal 的体外药物累积释放曲线 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 4 Cumulative release curves of Exos@Cal and FA-Exos@Cal ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

进行标记, 通过流式细胞术及荧光显微技术评价其靶向性摄取。将 RAW264.7 细胞以 3×10^5 个/孔接种于 6 孔板, 贴壁后加入脂多糖 ($1 \mu\text{g}/\text{mL}$) 诱导 12 h, 建立 M1 型巨噬细胞模型; 随后分为 5 组: PBS 对照组、Exos@C6 组、FA-Exos@C6 组、叶酸竞争性

抑制实验组 (FA+FA-Exos@C6)、FA-Lipo 组 (香豆素-6 浓度为 $5 \mu\text{mol}/\text{L}$), 每组 3 个复孔, FA+FA-Exos@C6 组需要提前 1 h 给予叶酸 (叶酸终浓度为 $10 \mu\text{mol}/\text{L}$), 随后与各组一起更换含对应制剂的培养基, 孵育 4 h 后, 收集各组细胞, PBS 重悬, 使用流式细胞术进行分析。

同样的细胞处理与制剂孵育 4 h 后, 吸弃培养基, PBS 洗涤 2 次, 4% 多聚甲醛固定 15 min, Hoechst 33342 染核 10min, 荧光显微镜下观察细胞内香豆素-6 荧光强度并拍摄图片。

流式细胞技术及荧光显微观察结果 (图 5、6 及表 2) 均显示, FA-Exos@C6 组细胞内荧光强度显著强于 Exos@C6 组 ($P < 0.001$), 证实叶酸修饰可显著增强 M1 型巨噬细胞对 Exos 的摄取; 叶酸竞争性抑制试验结果则进一步验证, FA-Exos@C6 的靶向摄取与叶酸介导有关; FA-Exos@C6 组的细胞内摄取量显著高于 FA-Lipo@C6 组, 说明 FA-Exos 除依赖叶酸实现靶向外, Exos 自身具有较好的巨噬

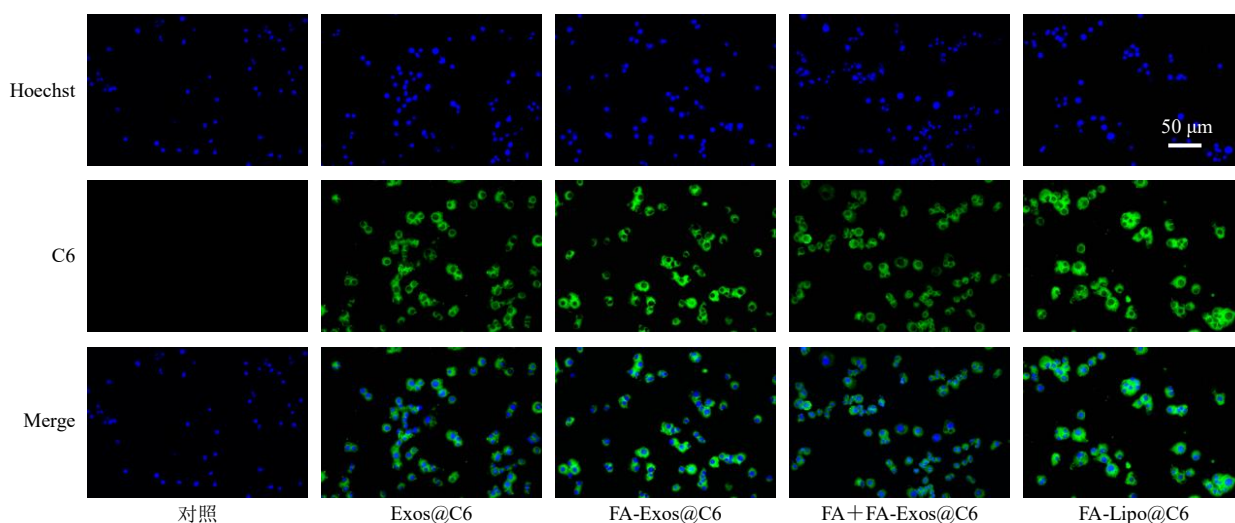


图5 FA-Exos 及参比制剂对 M1 型巨噬细胞靶向性的荧光显微镜观察 ($\times 20$)

Fig. 5 Fluorescence microscopy observation of targeting ability of FA-Exos and reference preparations to M1-type macrophages ($\times 20$)

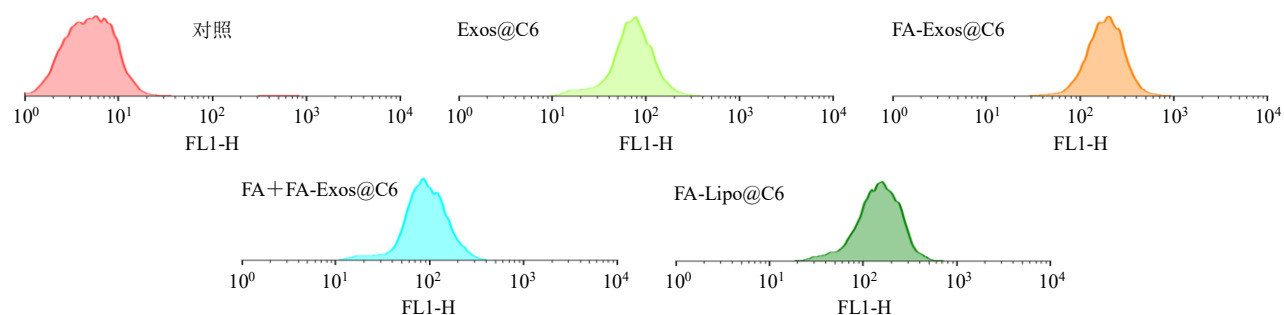


图6 FA-Exos 及参比制剂对 M1 型巨噬细胞的靶向摄取流式图

Fig. 6 Flow cytometry plots of targeting ability of FA-Exos and reference preparations to M1-type macrophages

表 2 FA-Exos 及参比制剂的细胞摄取 FL1-H 值及平均荧光强度统计分析 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 2 Statistical analysis of cellular uptake FL1-H values and mean fluorescence intensity of FA-Exos and reference preparations ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

样品	FL1-H	平均荧光强度
对照	5.21 ± 0.41	—
Exos@C6	78.00 ± 1.67***	150.60 ± 0.30
FA-Exos@C6	203.00 ± 6.56####	236.30 ± 6.17####
FA+FA-Exos@C6	98.57 ± 3.04 ^{AAA}	175.95 ± 9.40 ^{AAA}
FA-Lipo@C6	162.33 ± 2.51 ^{AAA}	203.84 ± 6.70 ^{AAA}

与对照组比较: *** $P < 0.001$; 与 Exos@C6 组比较: #### $P < 0.001$; 与 FA-Exos@C6 组比较: ^{AAA} $P < 0.001$ 。
 *** $P < 0.001$ vs control group; #### $P < 0.001$ vs Exos@C6 group; ^{AAA} $P < 0.001$ vs FA-Exos@C6 group.

细胞靶向性。

2.3 FA-Exos@Cal 对巨噬细胞增殖的影响

采用 CCK-8 法评估各制剂对脂多糖诱导的 RAW264.7 细胞活力的影响。将处于对数生长期 RAW264.7 细胞以 1×10^4 个/孔接种于 96 孔板, 贴壁后加入脂多糖 ($1 \mu\text{g/mL}$) 诱导 12 h。随后, 对激活的细胞分别用不同浓度的 Exos、毛蕊异黄酮、Exos@Cal、FA-Exos@Cal 进行处理 24 h。吸去培养液, 向每个孔中加入 $100 \mu\text{L}$ 10% 的 CCK-8 工作液, 并在 37°C 下孵育 2 h。使用酶标仪测量 450 nm 处的吸光度 (A) 值, 以此计算细胞活力。

细胞存活率 = $A_{\text{实验}} / A_{\text{空白}}$

结果如表 3、4 所示, 空白 Exos 在低质量浓度时, 促进巨噬细胞增殖作用显著, 当质量浓度逐渐增加, 其促进作用有所降低。当毛蕊异黄酮浓度 $\leq 40 \mu\text{mol/L}$ 时, 各组细胞存活率均 $> 90\%$; 当毛蕊异黄酮浓度为 $80 \mu\text{mol/L}$ 时, 游离毛蕊异黄酮、Exos@Cal、FA-Exos@Cal 组的细胞存活率分别为 (86.02 ± 3.23)%、(92.63 ± 2.10)%、(92.39 ± 1.44)%;

表 3 Exos 对 RAW264.7 细胞生长抑制作用 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 3 Growth inhibitory effects of Exos on RAW264.7 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Exos/ ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	细胞存活率/ %	Exos/ ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	细胞存活率/ %
0	100.00 ± 2.38	40	149.06 ± 7.64
5	176.20 ± 6.94**	60	137.08 ± 5.72
10	181.11 ± 5.22**	80	126.87 ± 5.92
20	161.01 ± 10.29	100	118.27 ± 9.23

与 $0 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 比较: ** $P < 0.01$ 。
 ** $P < 0.01$ vs $0 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ group.

表 4 FA-Exos@Cal 及参比制剂对 RAW264.7 细胞生长抑制作用 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 4 Growth inhibitory effects of FA-Exos@Cal and reference preparations ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

浓度/ ($\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)	细胞存活率/%		
	毛蕊异黄酮	Exos@Cal	FA-Exos@Cal
0	100.00 ± 1.64	100.00 ± 2.09	100.00 ± 1.57
5	97.49 ± 2.73	101.49 ± 1.13	100.71 ± 1.40
10	94.60 ± 2.80	99.67 ± 0.98	97.99 ± 1.01
20	94.73 ± 1.90	97.31 ± 2.13	97.07 ± 2.28
40	93.23 ± 3.05	95.65 ± 1.64	95.04 ± 2.42
80	86.02 ± 3.23	92.63 ± 2.10	92.39 ± 1.44
160	81.10 ± 3.26	89.94 ± 3.16*	86.43 ± 2.01
320	46.07 ± 2.54	70.27 ± 1.67***	63.40 ± 5.02**

与毛蕊异黄酮组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$ 。
 * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$ vs calycosin group.

毛蕊异黄酮浓度为 $320 \mu\text{mol/L}$ 时, FA-Exos@Cal 组的细胞存活率为 (63.40 ± 5.02)%, 显著高于游离毛蕊异黄酮组的存活率 ($P < 0.01$), 表明 FA-Exos 可降低毛蕊异黄酮的细胞毒性, 原因可能为载体包被的缓释作用, 以及 Exos 自身对巨噬细胞的促增殖作用。

2.4 FA-Exos@Cal 对巨噬细胞 M1 极化的影响

将 RAW264.7 细胞按 3×10^5 个/孔密度接种于 6 孔板, 设置对照组、模型组、Exos 组、毛蕊异黄酮组、Exos@Cal 组、FA-Exos@Cal 组、Exos 与毛蕊异黄酮的物理混合物组 (Exos&Cal PM)。除对照组外, 各组经脂多糖处理 12 h 诱导 M1 极化, 随后更换含对应制剂的培养基 (毛蕊异黄酮浓度为 $40 \mu\text{mol/L}$, Exos 蛋白质量浓度为 $84 \mu\text{g/mL}$) 培养 12 h 后, 细胞经 PE-CD86 在 4°C 下避光孵育 30 min, PBS 洗涤, 收集细胞进行流式分析, 结果如图 7 和表 5 所示, 模型组 CD86⁺ 细胞比例为 (75.4 ± 1.8)%; 与模型组相比, 未载药 Exos 组 CD86⁺ 细胞比例略降低, 载药后的 Exos@Cal 组 CD86⁺ 细胞比例显著降低至 (71.3 ± 1.2)% ($P < 0.05$); 经靶向修饰的 FA-Exos@Cal 组 CD86⁺ 细胞比例降至 (62.5 ± 2.0)%, 效果显著优于 Exos@Cal 组及 Exos 组 ($P < 0.01, 0.001$), 说明叶酸修饰可以显著提升巨噬细胞极化抑制作用。因制剂中药物的缓释特性, FA-Exos@Cal 的体外 M1 极化抑制效应弱于游离药物组及物理混合物组。同时, CD86⁺ 细胞比例的降低程度, 呈现物理混合物组 (Exos&Cal PM 组) $>$ 游离毛蕊异黄酮组 $>$ 未载药 Exos 组的趋势 ($P < 0.001$), 提示 Exos 与毛

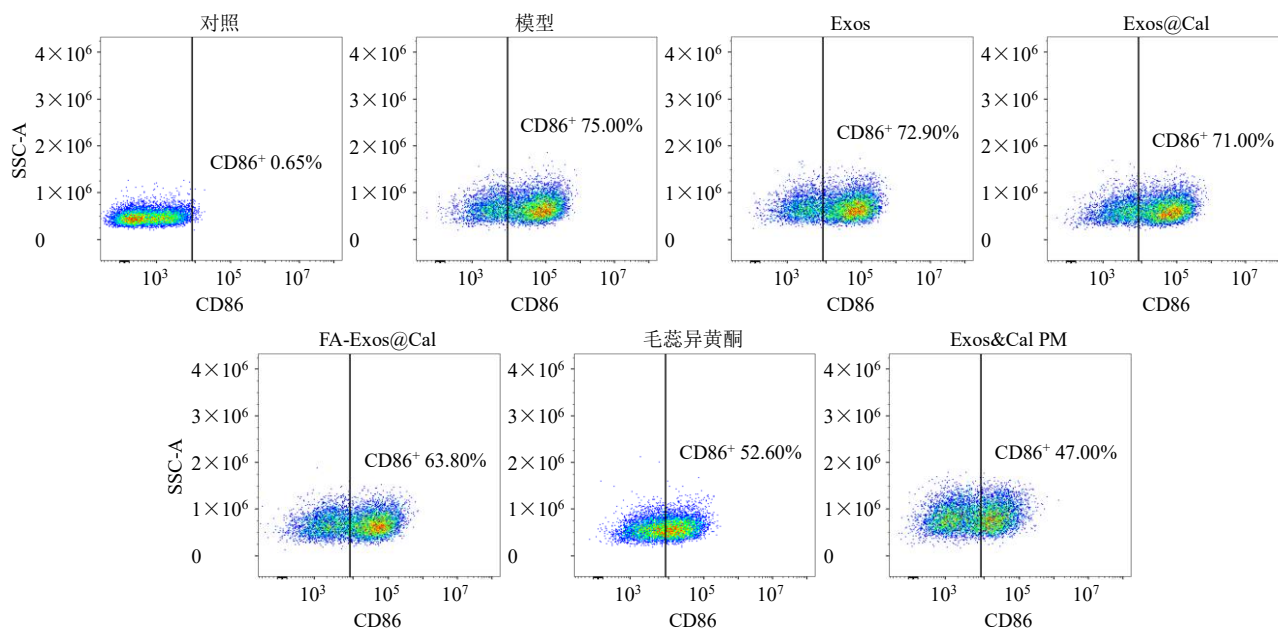


图 7 FA-Exos@Cal 及参比制剂抑制巨噬细胞 M1 型极化作用的 CD86⁺流式图

Fig. 7 CD86⁺ flow cytometry plots of inhibitory effect of FA-Exos@Cal and reference preparations on M1 polarization of macrophages

表 5 FA-Exos@Cal 及参比制剂对巨噬细胞 CD86 阳性率与炎症因子的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 5 Effects of FA-Exos@Cal and reference preparations on CD86 positive rate and inflammatory factors in macrophages ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

样品	CD86 ⁺ 比例/%	IL-6/(pg·mL ⁻¹)	IL-1β/(pg·mL ⁻¹)	TNF-α/(pg·mL ⁻¹)	NO/(μmol·mL ⁻¹)
对照	1.1 ± 0.4	74.49 ± 7.75	43.66 ± 2.29	86.00 ± 11.07	4.75 ± 0.18
模型	75.4 ± 1.8***	530.25 ± 21.08***	113.54 ± 7.84***	210.58 ± 14.70***	11.48 ± 0.47***
Exos	72.5 ± 1.1	449.22 ± 27.69##	103.78 ± 8.96	197.47 ± 15.40	10.53 ± 0.43#
Exos@Cal	71.3 ± 1.2#	322.30 ± 12.60###SSS	92.44 ± 5.66###S	171.42 ± 15.03###S	8.44 ± 0.36###SSS
FA-Exos@Cal	62.5 ± 2.0###SSAAA	241.68 ± 20.59###SSAAA	77.00 ± 6.43#####SAA	147.25 ± 10.46#####SAA	7.26 ± 0.25#####SAAA
毛蕊异黄酮	55.2 ± 1.8#####SAAA&&&	188.81 ± 19.90#####SAAA	65.53 ± 4.23#####SAAA	139.67 ± 9.06#####SAAA	6.71 ± 0.23#####SAAA
Exos&Cal PM	47.5 ± 1.3#####SAAA&&&^	147.47 ± 19.07#####SAAA&&&^^	53.70 ± 7.09#####SAAA&&&^^	118.62 ± 8.98#####SAAA&&^	6.09 ± 0.24#####SAAA&&^

与对照组比较: *** $P < 0.001$; 与模型组比较: # $P < 0.05$ ## $P < 0.01$ ### $P < 0.001$; 与 Exos 组比较: $S P < 0.05$ $SS P < 0.01$ $SSS P < 0.001$; 与 Exos@Cal 组比较: $\Delta P < 0.05$ $\Delta\Delta P < 0.01$ $\Delta\Delta\Delta P < 0.001$; 与 FA-Exos@Cal 组比较: $\&\& P < 0.01$ $\&\&\& P < 0.001$; 与毛蕊异黄酮组比较: $\wedge P < 0.05$ $\wedge\wedge P < 0.01$ $\wedge\wedge\wedge P < 0.001$ vs control group; # $P < 0.05$ ## $P < 0.01$ ### $P < 0.001$ vs model group; $S P < 0.05$ $SS P < 0.01$ $SSS P < 0.001$ vs Exos group; $\Delta P < 0.05$ $\Delta\Delta P < 0.01$ $\Delta\Delta\Delta P < 0.001$ vs Exos@Cal group; $\&\& P < 0.01$ $\&\&\& P < 0.001$ vs FA-Exos@Cal group; $\wedge P < 0.05$ $\wedge\wedge P < 0.01$ $\wedge\wedge\wedge P < 0.001$ vs calycosin group.

蕊异黄酮联用可产生协同增效效应。

2.5 FA-Exos@Cal 对炎症因子表达的影响

细胞分组与处理同“2.4”项, 药物处理 12 h 后, 吸取各组细胞上清, 4 °C、12 000 × g 离心 10 min, 按照 ELISA 试剂盒说明书操作, 酶标仪测定 450 nm 处 A 值, 计算 IL-6、IL-1β、TNF-α 质量浓度; 按照 NO 试剂盒说明书操作, 酶标仪测定 540 nm 处 A 值, 计算 NO 浓度。结果如表 5 所示, 含有毛蕊异黄酮的各给药组 IL-6、IL-1β、TNF-α、NO 4 种炎症因子的表达均显著低于模型组 ($P < 0.01$ 、0.001), 提示毛蕊异黄酮具有良好的抗炎活性; Exos 组的

IL-6 的质量浓度、NO 的浓度显著低于模型组 ($P < 0.05$ 、0.01), 表明 Exos 自身亦具备一定抗炎作用; 而载药的 Exos@Cal 在抑制 IL-6、IL-1β、TNF-α 及 NO 方面显著优于 Exos ($P < 0.05$ 、0.001), 凸显毛蕊异黄酮与 Exos 的联用优势。FA-Exos@Cal 组对 4 种炎症因子的抑制效果亦显著优于 Exos@Cal 组 ($P < 0.05$ 、0.01、0.001), 体现出靶向性修饰通过促进药物细胞内化增强的抗炎优势。

3 讨论

慢性炎症与疾病的发生发展密切相关, 如糖皮质激素类免疫抑制剂虽有抗炎效果, 但同时削弱正

常的免疫防御功能,非甾体抗炎药亦有严重的胃肠道不良反应等。大量研究表明巨噬细胞 M1 型极化是慢性炎症的关键驱动因素。因此,开发可精准靶向 M1 型巨噬细胞并有效抑制其 M1 极化的药物是突破现有炎症治疗瓶颈,实现安全有效治疗的关键。靶向药物的疗效高度依赖纳米载体的选择,其直接决定药物递送效率与最终治疗效果。传统人工合成载体如脂质体、聚合物纳米粒等存在生物相容性差、易被清除等问题^[10-11],近年植物源 Exos 虽成为研究热点,但多数将其作为单纯的药物递送载体,对其与负载药物的协同作用挖掘尚不充分。

本研究选择黄芪来源 Exos,优势体现在以下 2 个方面:一是黄芪作为中医“扶正固本”药材归肺、脾经^[18],而肺主皮毛防御、脾主气血运化的生理功能,使其解剖分布与免疫细胞富集区域高度契合,这赋予黄芪 Exos 天然的免疫靶向倾向;二是黄芪 Exos 自身含有多种活性成分,具有固有抗炎活性^[14],实现“载体即药物”的协同效应,从而区别于仅作载体使用的 Exos。

主动靶向修饰是提升治疗效果的关键。现有植物来源 Exos 靶向研究多聚焦肿瘤相关巨噬细胞^[19],针对炎症 M1 型巨噬细胞的设计较少。本研究首次将叶酸-叶酸受体靶向与黄芪 Exos 天然免疫靶向结合,形成“主动+天然”双重优势。流式与荧光实验证实,叶酸修饰组细胞内荧光强度显著高于未修饰 Exos,且叶酸竞争性抑制后摄取量明显降低,直接验证叶酸受体介导的主动靶向;同时 FA-Exos 的胞内摄取量优于传统叶酸修饰脂质体,推测 Exos 表面成分与巨噬细胞膜上的受体产生相互作用,为靶向摄取提供了辅助效应。

结合文献调研与本研究结果,推测 FA-Exos@Cal 抑制 M1 型巨噬细胞极化的机制涉及 3 条通路的协同调控:一是 NF- κ B 通路,毛蕊异黄酮可抑制 NF- κ B p65 亚基的核转移^[20],黄芪 Exos 内可能存在的黄芪甲苷等活性物质也能抑制 p-NF- κ B p65 的表达水平^[21],二者协同阻断通路,减少 IL-1 β 、TNF- α 等促炎因子生成;二是 JNK/丝裂原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase, MAPK)通路,毛蕊异黄酮本身抑制 JNK 磷酸化^[6],FA-Exos@Cal 可以通过提升靶向性,协同增强通路抑制效果;三是脊椎蛋白 2-转化生长因子- β /SMAD 家族成员 2 (Spondin 2-transforming growth factor- β /SMAD family member 2, Spon2-TGF- β /Smad2) 通

路: FA-Exos@Cal 中毛蕊异黄酮可下调 Spon2,解除其对 TGF- β /Smad2 通路的抑制,进而调控巨噬细胞极化^[22]。本研究成功制备 FA-Exos@Cal 并证实其良好的 M1 型巨噬细胞靶向性及抗炎活性,但仍存在不足,如仅完成体外验证,缺乏体内动物实验数据;载药率待提升;分子机制未实验证实。未来需开展炎症动物模型实验,验证体内疗效与安全性;通过 Western blotting、RT-PCR 等技术验证关键信号通路,明确协同机制;通过优化药物与载体比例、筛选适宜促渗剂、调整载药时间等提高毛蕊异黄酮的负载效率。

综上,本研究基于“中医理论+现代纳米技术”的融合思路,成功构建了双重靶向的 FA-Exos@Cal 制剂,证实其具有靶向 M1 型巨噬细胞及高效抗炎的特性,为炎症性疾病的靶向治疗提供了新型候选制剂,也为天然药物的载体优化与作用机制研究提供了新的思路与参考。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Luo M, Zhao F K, Cheng H, *et al.* Macrophage polarization: An important role in inflammatory diseases [J]. *Front Immunol*, 2024, 15: 1352946.
- [2] Yan L F, Wang J, Cai X, *et al.* Macrophage plasticity: Signaling pathways, tissue repair, and regeneration [J]. *MedComm*, 2024, 5(8): e658.
- [3] Atri C, Guerfali F Z, Laouini D. Role of human macrophage polarization in inflammation during infectious diseases [J]. *Int J Mol Sci*, 2018, 19(6): 1801.
- [4] Gong G W, Zheng Y Z, Yang Y, *et al.* Pharmaceutical values of calycosin: One type of flavonoid isolated from *Astragalus* [J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2021, 2021: 9952578.
- [5] 余润宇, 赵文昌, 杨芷胭, 等. 毛蕊异黄酮抗炎作用研究进展 [J]. *中草药*, 2025, 56(6): 2238-2248.
- [6] Liu Y, Fang Y, Han H H, *et al.* Calycosin ameliorates collagen-induced arthritis by suppressing the inflammation response in macrophages via the JNK and NF- κ B pathway [J]. *J Funct Foods*, 2023, 110: 105843.
- [7] Wang H L, Peng Z, Li Y Q, *et al.* Calycosin inhibited MIF-mediated inflammatory chemotaxis of macrophages to ameliorate ischemia reperfusion-induced acute kidney injury [J]. *Inflamm Res*, 2024, 73(8): 1267-1282.
- [8] 方叶. 加味牛蒡子汤及毛蕊异黄酮减轻 LECs 炎症治疗类风湿关节炎的研究 [D]. 淮南: 安徽理工大学, 2022.

- [9] Zhou Y, Liu Q H, Liu C L, *et al.* Calycosin induces apoptosis in human ovarian cancer SKOV3 cells by activating caspases and Bcl-2 family proteins [J]. *Tumour Biol*, 2015, 36(7): 5333-5339.
- [10] 曹颖, 王豆, 李金玲, 等. 植物源纳米囊泡载药技术研究进展与应用前景分析 [J]. *中草药*, 2025, 56(19): 6913-6926.
- [11] Elsharkasy O M, Nordin J Z, Hagey D W, *et al.* Extracellular vesicles as drug delivery systems: Why and how? [J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2020, 159: 332-343.
- [12] Wang R N, Zhang Y J, Guo Y M, *et al.* Plant-derived nanovesicles: Promising therapeutics and drug delivery nanoplatforams for brain disorders [J]. *Fundam Res*, 2023, 5(2): 830-850.
- [13] Tembo K M, Wang X H, Bolideci M, *et al.* Exploring the bioactivity of microRNAs originated from plant-derived exosome-like nanoparticles (PELNs): Current perspectives [J]. *J Nanobiotechnology*, 2025, 23(1): 563.
- [14] Yuan Y, Gao W J, Gao Y X, *et al.* *Astragali Radix* vesicle-like nanoparticles improve energy metabolism disorders by repairing the intestinal mucosal barrier and regulating amino acid metabolism in sleep-deprived mice [J]. *J Nanobiotechnology*, 2024, 22(1): 768.
- [15] Xia W, Hilgenbrink A R, Matteson E L, *et al.* A functional folate receptor is induced during macrophage activation and can be used to target drugs to activated macrophages [J]. *Blood*, 2009, 113(2): 438-446.
- [16] Han R N, Zhou D Y, Ji N, *et al.* Folic acid-modified ginger-derived extracellular vesicles for targeted treatment of rheumatoid arthritis by remodeling immune microenvironment via the PI3K-AKT pathway [J]. *J Nanobiotechnology*, 2025, 23(1): 41.
- [17] Xu H Y, Hu D X, Liu S X, *et al.* Folic acid-modified ginger-derived exosome-like nanoparticles co-delivering sunitinib suppress renal cell carcinoma via PI3K-Akt pathway inhibition, P-gp downregulation, and macrophage reprogramming [J]. *Adv Sci*, 2026, 13(6): e12563.
- [18] 中国药典 [S]. 一部. 2025: 387.
- [19] 郭佳鑫, 陈富财, 史亚博, 等. 中草药细胞外囊泡调控肿瘤免疫抑制微环境在癌症治疗中的研究进展 [J]. *中草药*, 2025, 56(19): 6875-6885.
- [20] Ma R, Yuan F, Wang S X, *et al.* Calycosin alleviates cerulein-induced acute pancreatitis by inhibiting the inflammatory response and oxidative stress via the p38 MAPK and NF- κ B signal pathways in mice [J]. *Biomed Pharmacother*, 2018, 105: 599-605.
- [21] 杨长超, 李国婷, 刘琳, 等. 黄芪甲苷通过 cGAS/STING/NF- κ B 通路抑制 LPS 诱导的 RAW264.7 巨噬细胞极化调控其迁移 [J]. *中国药理学通报*, 2025, 41(7): 1290-1297.
- [22] Chen G Y, Li X G, Zhang J Y, *et al.* Calycosin ameliorates inflammation and M1 macrophage polarization via Spon2 in LPS-triggered MH-S alveolar macrophages [J]. *J Nat Med*, 2025, 79(6): 1389-1403.

[责任编辑 郑礼胜]