

• 药剂与工艺 •

外泌体纯化和药物递送系统的工艺优化：提升人参皂苷 Rg₁ 跨血脑屏障效率的天然载体

李梦茹¹, 张明世¹, 尹秋燕¹, 张德赟¹, 叶彤¹, 石艳雪¹, 闫滨^{1*}, 白天凯^{2*}

1. 山东中医药大学药学院, 山东 济南 250355

2. 内蒙古民族大学, 内蒙古 通辽 028000

摘要:目的 筛选外泌体最佳纯化与载药工艺, 构建体外血脑屏障 (blood brain barrier, BBB) 细胞模型和阿尔茨海默病小鼠 (Alzheimer's disease, AD) 模型, 探究人胚肾 293 亚系 (human embryonic kidney 293T, HEK 293T) 细胞外泌体 (exosome, Exo) 介导人参皂苷 Rg₁ (ginsenoside Rg₁, Rg₁) 跨 BBB 效率, 为脑部疾病治疗提供依据。方法 分别采用超速离心法、切向流法、双耦合谐波振荡技术纯化外泌体, 以浓度、粒径及多分散性指数 (polydispersity index, PDI) 为评价指标, 选取最佳纯化方法; 在电转电压、脉冲时间、脉冲次数、Rg₁ 质量浓度单因素筛选的基础上, 以药物包封率为评价指标, 利用正交设计优化电穿孔法构建 Exo-Rg₁ 复合物的工艺; 采用小鼠微脑血管内皮细胞 (brain endothelial cell line 3, bEnd.3) 构建体外 BBB 模型, 通过测定跨内皮电阻 (transendothelial electrical resistance, TEER)、液面渗透及荧光素钠渗透实验验证模型完整性; 设置 Exo-Rg₁ 复合物组 (实验组)、游离 Rg₁ 组 (对照组)、单外泌体组和外泌体 (空载) + 游离 Rg₁ 组, 采用 HPLC 检测不同时间点药物透过体外 BBB 细胞模型的浓度, 计算透过效率。通过 AD 模型小鼠的行为学实验、组织学观察、蛋白与炎症因子检测, 评估体内治疗效果。**结果** 最佳纯化外泌体工艺为双耦合谐波振荡技术, 所得外泌体浓度为 2.9×10^{11} 个/mL, 粒径集中在 (91.8 ± 1.5) nm, PDI 为 0.21 ± 0.01 ; 优化后的最佳电穿孔法电转工艺为电转电压 100 V、脉冲时间 15 ms、脉冲次数 5 次和 Rg₁ 质量浓度为 0.4 mg/mL, 此条件下复合物包封率为 61.58%, 优于传统的超声法; 成功构建 bEnd.3 细胞体外 BBB 模型, TEER 值稳定在 $300 \Omega \cdot \text{cm}^2$ 以上, 并且 4 h 后体外 BBB 模型组仍能保持明显的液面差, 模型组荧光素钠透过率显著小于空白对照组 [$(41.34 \pm 1.83) \% \text{ vs } (98.87 \pm 2.09) \%$, $P < 0.01$], 符合屏障功能要求; 体外透过实验显示, 8 h 实验组 Rg₁ 透过效率 (15.3%) 显著高于对照组 (3.3%) ($P < 0.05$); 动物实验显示, 复合物可显著改善模型小鼠学习记忆能力, 保护海马神经元, 上调胆碱乙酰转移酶 (choline acetyltransferase, ChAT) 及 $\alpha 7$ 烟碱型乙酰胆碱受体 ($\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptor, $\alpha 7$ nAChR) 相关蛋白表达, 降低白细胞介素-1 β (interleukin-1 β , IL-1 β)、IL-6 和肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α) 炎症因子水平, 且效果优于游离 Rg₁ 组与单外泌体组。**结论** 外泌体可有效提升 Rg₁ 跨越 BBB 的效率, 为改善脑部疾病治疗效果提供实验依据。

关键词: 外泌体; 人参皂苷 Rg₁; 血脑屏障; 药物递送系统; bEnd.3 细胞; 双耦合谐波振荡技术; 胆碱乙酰转移酶; $\alpha 7$ 烟碱型乙酰胆碱受体; 白细胞介素-1 β ; 肿瘤坏死因子- α

中图分类号: R283.6 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2026)12-4570-12

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2026.12.006

Process optimization of exosome purification and process optimization of drug delivery systems: Natural carriers to enhance blood brain barrier penetration efficiency of ginsenoside Rg₁

LI Mengru¹, ZHANG Mingshi¹, YIN Qiuyan¹, ZHANG Deyun¹, YE Tong¹, SHI Yanxue¹, YAN Bin¹, BAI Tiankai²

收稿日期: 2026-01-23

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (82374311)

作者简介: 李梦茹, 女, 硕士研究生, 研究方向为中药化学。E-mail: abbbbh2025@163.com

*通信作者: 闫滨, 男, 教授, 硕士生导师, 研究方向为中药化学。E-mail: robinyan2002@163.com

白天凯, 男, 讲师, 研究方向为临床中药学。E-mail: baitiankai1990@163.com

1. College of Pharmacy, Shangdong University of Traditional Chinese Medicine, Jinan 250355, China
2. Inner Mongolia Minzu University, Tongliao 028000, China

Abstract: Objective To screen the optimal purification and drug-loading processes of exosomes (Exo), construct an *in vitro* blood-brain barrier (BBB) cell model and an Alzheimer's disease (AD) mouse model, and investigate the efficiency of human embryonic kidney 293T (HEK 293T) Exo-mediated ginsenoside Rg₁ (Rg₁) across the BBB, so as to provide a basis for the treatment of brain diseases. **Methods** Exosomes were purified using ultracentrifugation, tangential flow filtration, and dual-coupled harmonic oscillation technology. The optimal purification method was selected based on concentration, particle size, and polydispersity index (PDI). On the basis of single-factor screening of voltage, pulse duration, pulse number, and Rg₁ concentration, the electroporation process for constructing Exo-Rg₁ complexes was optimized using orthogonal design with drug encapsulation efficiency as the evaluation index. An *in vitro* BBB model was established using brain endothelial cell line 3 (bEnd.3). Model integrity was verified by measuring transendothelial electrical resistance (TEER), liquid level permeability, and sodium fluorescein permeability. The Exo-Rg₁ complex group (experimental group), free Rg₁ group (control group), exosome alone group, and empty exosome + free Rg₁ group were set up. The concentration of Rg₁ penetrating the *in vitro* BBB model at different time points was detected by HPLC, and the permeability efficiency was calculated. *In vivo* therapeutic effects were evaluated through behavioral tests, histological observation, and detection of protein and inflammatory factor levels in AD model mice. **Results** The optimal exosome purification process was dual-coupled harmonic oscillation technology, yielding an exosome concentration of 2.9×10^{11} particles/mL, a particle size of (91.8 ± 1.5) nm, and a PDI of 0.21 ± 0.01 . The optimized electroporation conditions were voltage of 100 V, pulse duration of 15 ms, pulse number of four times, and Rg₁ concentration of 0.4 mg/mL. Under these conditions, the encapsulation efficiency of the complexes was 61.58%, which was superior to that of the traditional ultrasonic method. The *in vitro* BBB model using bEnd.3 cells was successfully established, with TEER values stably above $300 \Omega \cdot \text{cm}^2$. A significant liquid level difference was maintained in the *in vitro* BBB model group after 4 h. The sodium fluorescein permeability in the model group was significantly lower than that in the blank control group [$(41.34 \pm 1.83)\%$ vs $(98.87 \pm 2.09)\%$, $P < 0.01$], meeting the requirements for barrier function. *In vitro* penetration experiments showed that the penetration efficiency of Rg₁ in the experimental group (15.3%) was significantly higher than that in the control group (3.3%) at 8 h ($P < 0.05$). Animal experiments demonstrated that the complex significantly improved learning and memory abilities in model mice, protected hippocampal neurons, upregulated the expression of choline acetyltransferase (ChAT) and $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptor ($\alpha 7$ nAChR) proteins, and reduced the levels of interleukin-1 β (IL-1 β), IL-6, and tumor necrosis factor- α (TNF- α), with effects superior to those of the free Rg₁ group and the exosome-only group. **Conclusion** Exosomes can effectively enhance the efficiency of Rg₁ in crossing the BBB, providing an experimental basis for improving the therapeutic effect of brain diseases.

Key words: exosome; ginsenoside Rg₁; blood-brain barrier; drug delivery systems; bEnd.3 cells; dual-coupled harmonic oscillation technology; choline acetyltransferase; alpha-7 nicotinic acetylcholine receptor; interleukin-1 β ; tumor necrosis factor- α

中枢神经系统疾病，如阿尔茨海默病 (Alzheimer's disease, AD)、脑缺血等，因其高致残率，已成为全球公共卫生亟待解决的难题之一，其临床治疗核心瓶颈在于血脑屏障 (blood-brain barrier, BBB) 的严格阻隔作用——脑微血管内皮细胞紧密连接等结构，使98%小分子药物与几乎100%大分子药物无法有效穿透，难以达到治疗浓度发挥药效^[1]。因此，开发高效 BBB 递送系统是突破该困境的关键。

中药活性成分人参皂苷 Rg₁ (ginsenoside Rg₁, Rg₁) 具有明确神经保护作用，可通过抑制炎症、减少氧化应激等途径改善脑缺血、AD 等病理损伤^[2-3]，但其临床转化受双重限制：亲水性强 ($\lg P \approx 1.2$) 导致 BBB 穿透困难，且体内半衰期仅 1.5~2.5 h、易

被代谢，脑部药物浓度不足^[4-6]。构建靶向递送系统提升其 BBB 透过效率与稳定性迫在眉睫。

外泌体 (exosome, 30~200 nm 天然囊泡) 因生物相容性好、低免疫原性及靶向性，成为理想药物载体^[7]。其中，人胚肾 293 亚系 (human embryonic kidney 293T, HEK 293T) 细胞，增殖能力强、培养条件简单，相较于肿瘤细胞来源的外泌体可能携带的癌基因、促炎因子，293T 细胞外泌体不会引发强烈的机体免疫排斥反应，也减少了潜在的生物安全隐患，更适合作为体内药物递送的载体，其脂质膜可包裹药物防降解，表面 CD63 等蛋白介导靶向结合，还能通过胞吞-胞吐等途径穿透 BBB^[8-10]，已成功提升紫杉醇、siRNA 等的脑部递送效率^[11]。外泌体纯化均一性、载药工艺仍存瓶颈。

针对上述问题,近年来发展出一系列改善策略:在纯化技术方面,双耦合谐波振荡技术通过低频振荡与负压协同作用,在温和条件下实现外泌体的高效捕获,既避免了机械力对膜结构的破坏,又通过纳米芯片的特异性筛选提升了产物均一性,可获得粒径集中、浓度高的外泌体制剂,该技术发表于 *Nature Methods*, 被国际学界公认为突破传统膜分离瓶颈的革新方案^[12-13]。而在载药工艺方面,电穿孔法通过瞬时高压在外泌体膜上形成可逆孔道,实现药物的被动装载,但需优化电转电压、脉冲次数等工艺参数以避免膜损伤^[14]。因此,优化纯化与载药工艺的协同匹配,是推动外泌体递送系统临床转化的关键。基于此,本研究构建 293T 细胞外泌体介导的 R_{g1} 透过 BBB 的递送系统。对比超速离心法、切向流法与双耦合谐波振荡技术,筛选高均一性外泌体载体;采用电穿孔法载药,通过 L₉(3⁴) 正交试验优化电转电压、脉冲次数等参数提升包封率;利用 bEnd.3 细胞构建体外 BBB 模型和 AlCl₃+D-半乳糖诱导 AD 小鼠模型,验证递送效率,为中药成分 R_{g1} 治疗脑部疾病提供支撑。

1 仪器与材料

1.1 仪器

ÄKTA flux 型切向流过滤系统,上海 Cytiva 公司; Zeta View 型纳米颗粒跟踪分析仪 (NTA),德国 Particle Metrix 公司; Optima XPN-100 型智能型超速离心机,美国 Beckman Coulter 公司; Agilent 1260 型高效液相色谱仪,美国 Agilent 公司; Exodus H-300 型全自动外泌体提取系统,深圳汇芯生物科技有限公司; CKX-31 型倒置显微镜,日本 Olympus 公司; JEM-1400 型透射电子显微镜,日本 JEOL 公司; Morris 水迷宫,安徽正华生物仪器设备有限公司; ECM 830 型电穿孔仪,美国 BTX 公司; Millicell ERS-2 型跨内皮电阻仪,美国 Millipore 公司。

1.2 试剂

R_{g1} (批号 B21057, HPLC 质量分数 ≥98.0%)、2% 磷钨酸负染色液,上海源叶生物科技有限公司; DMEM 高糖培养基、胎牛血清,美国 Gibco 公司; 磷酸盐缓冲液 (PBS), pH 7.4, 北京索莱宝科技有限公司; 胰蛋白酶、乙二胺四乙酸 (ethylene diamine tetraacetic acid, EDTA), 美国 Sigma-Aldrich 公司; BCA 蛋白定量试剂盒,上海碧云天生物技术有限公司; 8 000~250 000 蛋白 Marker, 杭州信天翁半导体有限公司; HRP 标记山羊抗兔 IgG、Calnexin、

CD63 抗体,上海雅酶生物医药科技有限公司; 小鼠抗 GFP 单抗,北京中杉金桥生物技术有限公司; CD81、CD9 抗体,杭州景杰生物科技有限公司; 铜网,北京中镜科仪膜科技有限公司; 胆碱乙酰转移酶 (choline acetyltransferase, ChAT), 杭州华安生物技术有限公司; α7 烟碱型乙酰胆碱受体 (α7 nicotinic acetylcholine receptor, α7 nAChR), 武汉菲恩生物科技有限公司; 小鼠白细胞介素-1β (interleukin-1β, IL-1β)、IL-6、肿瘤坏死因子-α (tumor necrosis factor-α, TNF-α) ELISA 试剂盒 (批号分别为 ZC-37974、ZC-37988、ZC-39024), 上海茁彩生物科技有限公司。

1.3 细胞与动物

小鼠脑微血管内皮细胞 (bEnd.3), 武汉尚恩生物技术有限公司; 人胚肾 293 亚系细胞 (HEK 293T), 美国模式培养物集存库; 60 只 SPF 级雄性 C57BL/6J 小鼠, 6 周龄, (20±2) g, 购自济南朋悦动物繁育有限公司, 合格证号 SCXK(鲁)20220006。实验动物饲养环境及所有实验过程中均保持室温 (25±2) °C、相对湿度 (55±10) %。本实验得到山东中医药大学动物福利伦理委员会批准, 实验动物福利伦理审查号 SDUTCM20250701003。

2 方法与结果

2.1 外泌体的纯化

通过超速离心法、切向流法、双耦合谐波振荡技术 3 种方法对外泌体进行纯化。

2.1.1 超速离心法 取 293T 细胞, 培养于含 10% 胎牛血清的高糖 DMEM 培养基中, 待细胞融合度达 80%~90% 时, 收集细胞培养上清液, 以 300×g 离心 10 min, 去除细胞碎片, 以 10 000×g 离心 30 min 去除大囊泡, 取上清液置于超速离心管中, 以 120 000×g 离心 90 min, 弃上清, 用 PBS 重悬沉淀, 再次以 120 000×g 离心 90 min, 最终用 50 μL PBS 重悬得外泌体, -80 °C 保存, 备用。

2.1.2 切向流法 收集 293T 细胞培养上清液, 经 3 000×g 离心 10 min 和 0.22 μm 滤膜滤过除杂, 选用 300 000 截留相对分子质量膜材, 控制跨膜压 (transmembrane pressure, TMP) 10~30 kPa (0.1~0.3 bar)、滤出流量 5~10 mL/min, 浓缩 10~20 倍后, 用 3~5 倍体积缓冲液冲洗、滤过, 获得高纯度外泌体, -80 °C 保存, 备用。

2.1.3 双耦合谐波振荡技术 使用 Exodus (H-300) 外泌体纯化系统进行纯化, 取 20 mL 细胞上清液,

先后进行 $2\,000\times g$ 、30 min 和 $12\,000\times g$ 、30 min 的高速离心, 去除上清液中的细胞碎片等杂质, 使用 $0.22\ \mu\text{m}$ 孔径的微孔滤膜滤过, 选择 M 型纳米芯片, 设置对应提取程序进行外泌体的提取, 最后用 $50\ \mu\text{L}$ PBS 对芯片上的外泌体进行洗脱收集。

2.2 利用电穿孔法制备外泌体 (exosome, Exo) - Rg₁ 复合物

利用电穿孔法, 将外泌体与 Rg₁ 混合液加入 2 mm 电极杯, 设置最佳参数电转电压, 脉冲次数和脉冲时间, 电转后 $100\,000\times g$ 离心 1 h, 弃上清, PBS 重悬沉淀得 Exo-Rg₁ 复合物。

2.3 外泌体和 Exo-Rg₁ 复合物的表征分析

2.3.1 浓度与粒径测定 采用纳米颗粒跟踪分析技术 (nanoparticle tracking analysis, NTA), 将外泌体和 Exo-Rg₁ 复合物样品用 PBS 稀释至适宜浓度, 设置检测温度 $25\ ^\circ\text{C}$, 每个样品测定 3 次, 记录浓度、粒径分布, 指标对比见表 1, 双耦合谐波振荡技术纯化的外泌体浓度最高、粒径分布曲线最集中、峰值最尖锐, 并且多分散指数 (polydispersity index, PDI), 最接近 0 (通常 ≤ 0.3 为均一), 说明该纯化方法粒径最均一, 分布最均匀。

表 1 3 种纯化方法的外泌体及 Exo-Rg₁ 复合物指标对比 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 1 Comparison of exosome and Exo-Rg₁ complex indicators among three purification methods ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

样品	浓度/(个·mL ⁻¹)	粒径/nm	PDI
超速离心法外泌体	1.9×10^{10}	114.11 ± 4.57	0.44 ± 0.05
切向流法外泌体	4.9×10^{10}	104.97 ± 1.39	0.35 ± 0.07
双耦合谐波振荡技术外泌体	2.9×10^{11}	91.80 ± 1.50	0.21 ± 0.01
Exo-Rg ₁ 复合物	2.1×10^{10}	139.00 ± 3.12	0.67 ± 0.09

2.3.2 形态观察 用移液枪吸取 3 种纯化方法纯化的外泌体样品及 Exo-Rg₁ 复合物 $20\ \mu\text{L}$, 滴至亲水碳膜铜网上, 静置 15 min 左右使外泌体能够吸附在铜网上。水洗 3 次, 每次 5 min, 滤纸吸去浮液。吸取 $20\ \mu\text{L}$ 2% 磷钨酸溶液滴至铜网上进行负染 1 min, 滤纸吸去浮液, 干燥 10 min 后置于透射电子显微镜 (transmission electron microscope, TEM) 下观察外泌体形态并拍照, 结果如图 1 所示, 均呈典型杯状凹陷形态, 双层膜结构完整且边界清晰可见, 符合外泌体的特征性形态表现。

2.3.3 标志蛋白检测 采用 Western blotting 分析 3 种纯化方法纯化的外泌体及 Exo-Rg₁ 复合物蛋白,

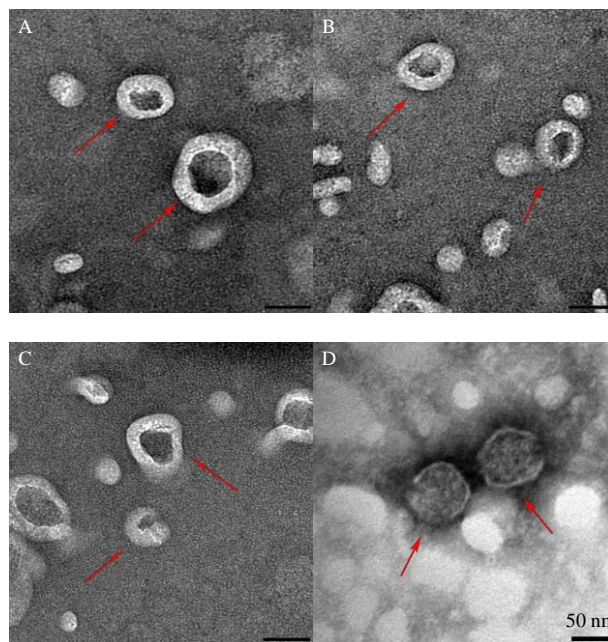


图 1 超速离心法纯化的外泌体 (A)、切向流法纯化的外泌体 (B)、双耦合谐波振荡技术纯化的外泌体 (C) 及 Exo-Rg₁ 复合物 (D) 的 TEM 图

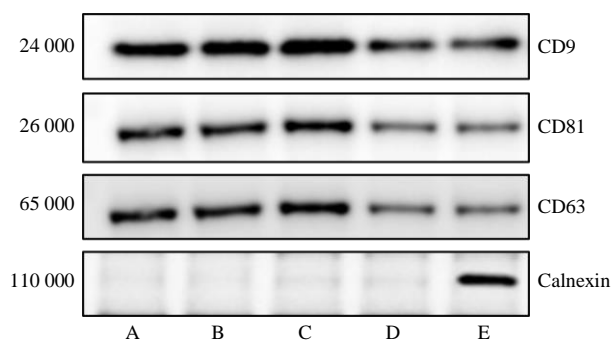
Fig. 1 TEM images of exosome isolated by ultracentrifugation (A), exosome isolated by tangential flow filtration (B), exosome isolated by dual-coupled harmonic oscillation technology (C) and Exo-Rg₁ complex (D)

利用 BCA 法定量后, 取 $20\ \mu\text{g}$ 蛋白上样, 经 SDS-PAGE 电泳、转膜、封闭后, 加入 CD63 (1 : 1 000)、CD81 (1 : 1 000)、CD9 (1 : 1 000)、Calnexin (1 : 1 000) 4 种由脱脂牛奶配制的一抗于 $4\ ^\circ\text{C}$ 孵育过夜, $200\ \text{r}/\text{min}$ 洗膜 15 min 后, 加入二抗 (1 : 5 000) 在室温下进行 $50\ \text{r}/\text{min}$ 、1 h 的孵育, 再次 $200\ \text{r}/\text{min}$ 洗膜 15 min 后, 进行 ECL 化学发光显影, Image J 分析条带灰度值。检测结果如图 2 所示, 3 种纯化方法纯化的外泌体以及 Exo-Rg₁ 复合物特异性标志物 CD9、CD63、CD81 均呈明显阳性条带, 而内质网来源的污染标志物 Calnexin 未检测到条带, 表明获得外泌体纯度良好。

2.4 包封率和载药率的测定

2.4.1 色谱条件 Zorbax Eclipse XDB-C₁₈ 色谱柱 ($250\ \text{mm} \times 4.6\ \text{mm}$, $5\ \mu\text{m}$); 流动相为乙腈-0.1% 磷酸水溶液 (22 : 78); 体积流量 $1.0\ \text{mL}/\text{min}$; 检测波长 $203\ \text{nm}$; 柱温 $30\ ^\circ\text{C}$ 。

2.4.2 对照品溶液的制备 取 Rg₁ 对照品适量, 精密称定, 置于 $10\ \text{mL}$ 量瓶中, 加 PBS 溶解并定容, 即得质量浓度为 $0.5\ \text{mg}/\text{mL}$ 的对照品储备液, 加 PBS



A-超速离心法纯化的外泌体; B-切向流纯化外泌体; C-双耦合谐波振荡技术纯化外泌体; D-Exo-Rg₁复合物; E-293T细胞。

A-exosome isolated by ultracentrifugation; B-exosome isolated by tangential flow filtration; C-exosome isolated by dual-coupled harmonic oscillation technology; D-Exo-Rg₁ complex; E-293T cells.

图2 Western blotting 鉴定蛋白标志物 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 2 Identification of protein markers by Western blotting ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

制成质量浓度为 0.300、0.100、0.050、0.010、0.005、0.001 mg/mL 的对照品溶液。

2.4.3 供试品溶液的制备 取 Exo-Rg₁ 复合物样品(电转后即刻从电转杯中吸出),在 4 °C、100 000×g 的条件下离心 1 h,取上清液,即得供试品溶液。

2.4.4 线性关系考察 吸取“2.4.2”项下制备的 0.500、0.300、0.100、0.050、0.010、0.005、0.001 mg/mL 的对照品溶液适量,按照“2.4.1”项下色谱条件进样测定峰面积,以对照品质量浓度为横坐标(X),峰面积为纵坐标(Y)绘制标准曲线,进行线性回归,得到线性回归方程为 $Y = 20\ 654 X + 10.95$, $R^2 = 0.999\ 3$,结果表明 Rg₁ 在 0.001~0.500 mg/mL 线性关系良好。

2.4.5 精密度试验 吸取“2.4.2”项下制备的 0.100 mg/mL 对照品溶液适量,按照“2.4.1”项下色谱条件连续进样 6 次,测定峰面积。计算得 Rg₁ 的 RSD 为 1.34%,结果表明该仪器精密度良好。

2.4.6 稳定性试验 按照“2.4.3”项下方法制备供试品溶液,分别在制备后 0、2、4、6、8、12、24 h,按照“2.4.1”项下色谱条件进样,测定峰面积,计算得 Rg₁ 峰面积的 RSD 为 1.64%,结果表明供试品溶液在 24 h 内稳定性良好。

2.4.7 重复性考察 按照“2.4.3”项下方法制备 6 份供试品溶液,按照“2.4.1”项下色谱条件进样,测定峰面积,计算得 Rg₁ 质量分数的 RSD 为 1.67%,结果表明该方法重复性良好。

2.4.8 加样回收率试验 取不含 Rg₁ 的空白外泌体悬液,经超速离心获得空白上清液,精密加入低、

中、高 3 个质量浓度(0.005、0.100、0.500 mg/mL)的 Rg₁ 对照品溶液,每个质量浓度平行制备 3 份,按照“2.4.1”项下色谱条件进样,计算得低、中、高质量浓度的平均加样回收率分别为 101.21%、100.52%、103.74%,RSD 值分别为 1.31%、1.52%、1.82%,结果表明该方法加样回收率良好。

2.4.9 包封率和载药率的测定方法 吸取 Exo-Rg₁ 复合物样品,在 4 °C、100 000×g 的条件下离心 1 h,取上清液,按照“2.4.1”项下色谱条件进行测定,并计算游离药物质量浓度。按公式计算包封率和载药率。

$$\text{包封率} = (\text{总药物质量} - \text{游离药物质量}) / \text{总药物质量}$$

$$\text{载药率} = (\text{总药物浓度} - \text{游离药物浓度}) / (\text{总药物质量} - \text{游离药物质量} + \text{载体质量})$$

2.5 单因素实验

2.5.1 电转电压 取外泌体样品,控制脉冲次数为 3 次、脉冲时间为 15 ms、Rg₁ 质量浓度为 0.2 mg/mL,设置不同电转电压条件(25、50、75、100、125 V)进行电穿孔载药,每个水平平行操作 3 次,测定包封率和载药率,结果见表 2。随着电转电压的增加,Rg₁ 的包封率先增加后降低,原因可能是电转电压过大时击穿膜结构,导致囊泡破裂、内容物泄漏,失去载药载体功能,故电转电压选择 50、75、100 V 进行后续正交试验。

表2 不同电转电压对包封率和载药率的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 2 Effects of different electroconversion voltages on encapsulation efficiency and drug loading rate ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

电转电压/V	包封率/%	载药率/%
25	17.03 ± 1.15	14.52 ± 0.86
50	34.47 ± 2.71	25.61 ± 1.47
75	52.97 ± 1.42	34.62 ± 0.66
100	48.83 ± 1.84	32.81 ± 0.78
125	33.30 ± 2.11	24.97 ± 1.15

2.5.2 脉冲次数 取外泌体样品,控制电转电压为 75 V、脉冲时间为 15 ms、Rg₁ 质量浓度为 0.2 mg/mL,设置不同脉冲次数(1、2、3、4、5 次)进行电穿孔载药,每个水平平行操作 3 次,测定包封率和载药率,结果见表 3。随着脉冲次数的增多,包封率不断增加,在脉冲次数为 5 次后包封率提升不明显,可能是因为初期脉冲增加可增多膜上孔道、延长开放时间,后期孔道已足够,继续增加次数无法进一步优化载药效果,因此,脉冲次数选择 3、4、5 次进行正交试验。

表3 不同脉冲次数对包封率和载药率的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 3 Effects of different pulse numbers on encapsulation efficiency and drug loading rate ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

脉冲次数/次	包封率/%	载药率/%
1	24.33±3.06	19.54±1.99
2	39.67±4.16	28.36±2.28
3	51.67±2.08	34.06±0.92
4	55.37±4.54	35.60±1.87
5	55.31±3.21	35.51±1.81

2.5.3 脉冲时间 取外泌体样品, 控制电转电压为75 V、脉冲次数为3次、Rg₁质量浓度为0.2 mg/mL, 设置不同脉冲时间(5、10、15、20、25 ms)进行电穿孔载药, 每个水平平行操作3次, 测定包封率和载药率, 结果见表4。随着脉冲时间的增加, 包封率先增加后降低, 原因可能是脉冲时间过长时膜结构被破坏, 此时已载入的药物会随膜损伤泄漏, 且新药物难以稳定留存, 最终导致包封率不升反降, 故脉冲时间选择10、15、20 ms进行正交试验。

2.5.4 Rg₁质量浓度 取外泌体样品(外泌体质量浓度固定为0.2 mg/mL), 控制电转电压为75 V、脉冲次数为3次、脉冲时间为15 ms, 设置不同Rg₁质量浓度(0.05、0.10、0.20、0.40、0.60 mg/mL)进行电穿孔载药, 每个水平平行操作3次, 测定包封率和载药率, 结果见表5。在外泌体质量浓度为0.2 mg/mL时, Rg₁质量浓度在0.10~0.40 mg/mL,

表4 不同脉冲时间对包封率和载药率的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 4 Effects of different pulse durations on encapsulation efficiency and drug loading rate ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

脉冲时间/ms	包封率/%	载药率/%
5	28.67±3.66	22.24±2.21
10	36.33±2.46	26.63±1.82
15	49.12±3.42	32.91±1.53
20	44.07±2.45	31.05±1.17
25	35.63±3.30	26.24±1.32

表5 不同Rg₁质量浓度对包封率和载药率的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 5 Effects of different Rg₁ concentrations on encapsulation efficiency and drug loading rate ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Rg ₁ /(mg·mL ⁻¹)	包封率/%	载药率/%
0.05	17.87±2.51	4.27±0.58
0.10	30.20±1.86	13.11±0.70
0.20	43.40±2.21	46.45±1.21
0.40	42.23±2.66	29.68±1.25
0.60	28.53±3.97	45.97±3.54

包封率随着质量浓度增加而提高; 而当质量浓度达到0.6 mg/mL时, 包封率显著下降, 可能是因为Rg₁超过饱和阈值后外泌体空间已完全占用, 或外泌体聚集破坏了体系的稳定性, 导致包封率反而下降, 因此, 选择Rg₁质量浓度为0.10、0.20、0.40 mg/mL进行正交试验。

2.6 正交试验优化 Exo-Rg₁的制备工艺

2.6.1 正交试验设计 在单因素优化试验结果的基础上, 选取电转电压(A)、脉冲次数(B)、脉冲时间(C)及Rg₁质量浓度(D)为考察因素, 每个因素选取3个水平, 采用L₉(3⁴)正交表设计4因素3水平正交试验, 以优化电穿孔法介导外泌体与Rg₁的结合工艺, 试验因素和水平设计见表6。

表6 L₉(3⁴)正交试验因素水平、试验方案及结果 (n = 3)

Table 6 L₉(3⁴) orthogonal test factor level, test scheme and results (n = 3)

试验号	A/V	B/次	C/ms	D/(mg·mL ⁻¹)	包封率/%
1	50 (1)	3 (1)	10 (1)	0.10 (1)	38.15
2	50 (1)	4 (2)	15 (2)	0.20 (2)	40.86
3	50 (1)	5 (3)	20 (3)	0.40 (3)	52.00
4	75 (2)	3 (1)	15 (2)	0.40 (3)	50.49
5	75 (2)	4 (2)	20 (3)	0.10 (1)	45.59
6	75 (2)	5 (3)	10 (1)	0.20 (2)	50.81
7	100 (3)	3 (1)	20 (3)	0.20 (2)	44.84
8	100 (3)	4 (2)	10 (1)	0.40 (3)	50.78
9	100 (3)	5 (3)	15 (2)	0.10 (1)	54.43
K ₁	43.67	44.49	46.58	46.04	
K ₂	48.96	45.74	48.58	45.50	
K ₃	50.00	52.40	47.48	51.09	
R	6.33	7.91	2.00	5.59	

同时, 为评估电穿孔法的优势, 设置传统超声法作为对照; 参照文献方法^[15], 超声法参数为超声功率120 W, 超声时间30 s(分3次进行, 每次10 s, 间隔2 s以防止过热), 物料比(外泌体与Rg₁质量比)为1:1, 超声载药后取出置于冰上冰浴10 min, 重复3次, 将离心管放入37 °C恒温水浴锅内, 孵育1 h。

2.6.2 正交试验结果 由表6、7结果可见, 因素B(脉冲次数)和因素D(Rg₁质量浓度)对包封率有显著影响(F>3.55); 因素A(电转电压)接近显著(F=3.30), 因素C(脉冲时间)影响不显著, 所以可以根据实际情况对其进行调整。极差分析可知, 4个因素对包封率的影响顺序为B>A>D>C, 即脉冲次数的影响最大, 其次为电转电压和Rg₁质

表7 正交试验结果方差分析

Table 7 Analysis of variance for orthogonal experimental results

方差来源	离均差平方和	自由度	均方	F值	F临界值
A	84.72	2	42.36	3.30	3.55
B	156.48	2	78.24	6.11	3.55
C	24.85	2	12.43	0.97	3.55
D	115.89	2	57.95	4.53	3.55
误差	230.43	18	12.80	-	

量浓度，脉冲时间的影响最小。结合极差分析的最优水平和方差分析的显著性，最终确定最优组合为A₃B₃C₂D₃，即电转电压100 V、脉冲次数5次、脉冲时间15 ms及Rg₁质量浓度0.40 mg/mL。由于该工艺组合未出现在正交试验中，故采用最优工艺组合进行3次验证试验，结果3次验证试验的包封率为61.15%、62.01%、61.58%，载药率为55.02%、55.36%、55.18%，包封率和载药率的平均值分别为61.58%、55.19%。传统超声法的包封率为30.12%，电穿孔法包封率显著高于超声法，表明优化后的电穿孔工艺在载药效率方面具有明显优势。

2.7 Rg₁的bEnd.3细胞毒性实验与体外BBB细胞模型构建

2.7.1 Rg₁的bEnd.3细胞毒性实验 将bEnd.3细胞用含10%胎牛血清、1%双抗的DMEM培养基，37℃、5%CO₂培养箱培养。毒性实验中，将细胞按每孔1×10⁴个细胞加入96孔板中孵育24 h，将Rg₁用无胎牛血清培养基配制成25、50、100、200、400、450、500、550、600 μmol/L的稀释液，采用CCK-8法检测不同浓度Rg₁处理bEnd.3细胞24 h后的细胞存活率，结果如表8所示。与对照组相比，Rg₁在25~550 μmol/L均未显示细胞毒性，细胞存活率均>95%；当浓度达600 μmol/L时，细胞存活率显著降低至94.88% (P<0.05)，显示细胞毒性。

表8 Rg₁对bEnd.3细胞的毒性作用 (x̄ ± s, n = 5)

Table 8 Cytotoxicity of Rg₁ on bEnd.3 cells (x̄ ± s, n = 5)

Rg ₁ / (μmol·L ⁻¹)	细胞存活率/ %	Rg ₁ / (μmol·L ⁻¹)	细胞存活率/ %
0 (对照)	100.00 ± 0.40	400	105.60 ± 3.91*
25	101.18 ± 0.97	450	104.49 ± 0.88*
50	102.27 ± 1.09	500	106.21 ± 1.75*
100	103.21 ± 0.83	550	102.42 ± 0.70
200	103.82 ± 0.50	600	94.88 ± 1.32*

与对照组比较: *P<0.05。

*P<0.05 vs control group.

实验独立重复5次，结果趋势一致 (RSD<5%)。因此，Rg₁的安全浓度范围为≤550 μmol/L，选择500 μmol/L作为后续跨BBB实验的给药浓度。

2.7.2 体外BBB细胞模型构建 在模型构建实验中，取对数生长期的bEnd.3细胞，调整浓度5×10⁴细胞/mL，取0.3 mL接种于Transwell小室上室（孔径0.4 μm，底面积4.67 cm²），下室加1.2 mL完全培养基，隔48 h换液，培养5~8 d形成致密单层。

2.7.3 体外BBB细胞模型验证 跨内皮电阻 (transendothelial electrical resistance, TEER) 值采用Millicell ERS-2电阻仪测定，每日选取不同位置重复测量3次取平均值，同步测定空白Transwell小室电阻，按公式实际TEER=(测定值-空白小室电阻)×4.67计算，实验结果见图3，表明该模型中细胞紧密连接程度，与模型建立时间具有一定关联性，于建立4~6 d呈现明显的增长趋势，最高可达(300±15) Ω·cm²，于7~8 d基本保持稳定，证明该模型构建成功，并且紧密连接程度高，屏障结构完整，具备BBB的紧密连接特性。

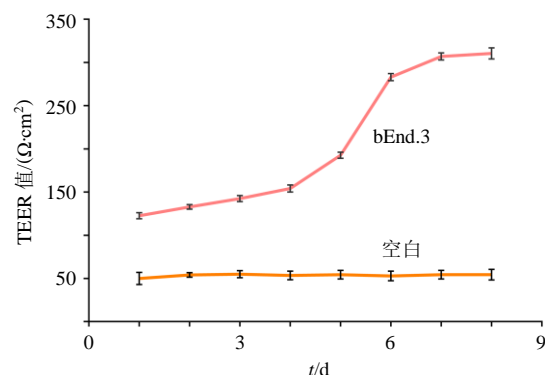


图3 体外BBB模型不同时间TEER值变化情况 (x̄ ± s, n = 3)

Fig. 3 Changes of TEER values at different time points in *in vitro* BBB model (x̄ ± s, n = 3)

模型稳定后开展液面渗漏试验，结果如图4所示，体外BBB模型组和对照组（未接种细胞小室）Transwell内侧与外侧培养基的液面差≥0.5 cm，继续培养4 h后，体外BBB模型组可见液面仍保持明显差距，而对照组液面差消失；表明内皮细胞已致密呈膜，可用于进行下一步实验。

构建成功的体外BBB模型Transwell小室移入新的6孔板，以无细胞小室为空白对照，每组3复孔。上室加入含10 mg/L荧光素钠的PBS (pH 7.4)，下室加入2.5 mL PBS。培养2 h后，从上、下室各取200 μL测定荧光强度。同时测定系列质量浓度

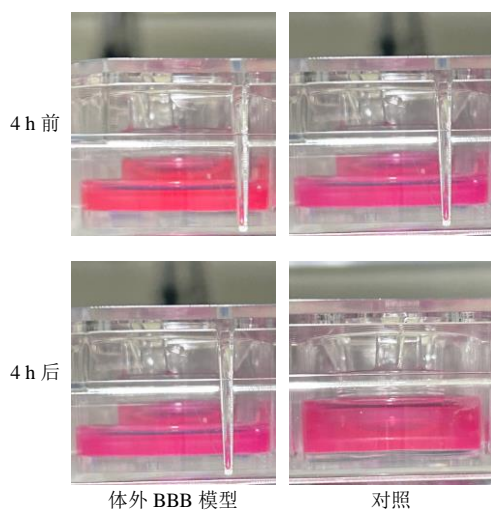


图4 液面渗漏试验
Fig. 4 Liquid leakage test

(5 000.00、2 500.00、1 250.00、625.00、312.50、156.25 $\mu\text{g/L}$) 荧光素钠标准品的荧光强度，绘制标准曲线。按公式计算通透率。荧光素钠通透性实验结果显示，空白对照组小室表现出良好的通透性，BBB 模型组荧光素钠透过率显著小于空白对照组 [(41.34 \pm 1.83) % vs (98.87 \pm 2.09) %， $P < 0.01$]。

通透率 = 下室荧光值 / 上室荧光值

2.8 Exo-Rg₁ 跨越体外 BBB 细胞模型实验

基于“2.7”项下细胞毒性实验考察结果，Rg₁ 在 25~550 $\mu\text{mol/L}$ 对 bEnd.3 细胞无显著毒性，其中，500 $\mu\text{mol/L}$ 浓度点细胞存活率显著升高至 106.21% ($P < 0.05$)，表明该浓度具有良好的细胞相容性。为确保跨 BBB 实验中药物浓度处于安全范围且能获得可检测的透过量，选择 500 $\mu\text{mol/L}$ 作为实验浓度；设置 4 组进行跨越体外 BBB 细胞模型实验，分别为实验组 (Exo-Rg₁ 复合物，Rg₁ 终浓度 500 $\mu\text{mol/L}$)、对照组 (游离 Rg₁，终浓度 500 $\mu\text{mol/L}$)、空白对照组 (单外泌体)、外泌体 (空载) + 游离 Rg₁，每组 6 个复孔。模型构建成功后，分别按每孔 200 μL 的体积加入模型上室，下室侧缓慢加入 1.2 mL 预热至 37 $^{\circ}\text{C}$ 的无血清 DMEM 培养基。分别在 1、2、4、6、8 h 收集下室样品 200 μL ，加入 600 μL 甲醇，涡旋混合 1 min，离心 10 min (13 000 r/min)，取上清液进液相检测样品中 Rg₁ 浓度，色谱条件同“2.4”项。按照公式计算各成分透过效率。

不同时间点 Rg₁、Exo-Rg₁、单外泌体和外泌体 (空载) + 游离 Rg₁ 的透过效率见图 5，外泌体和 Exo-Rg₁ 组，在各时间点透过效率均显著高于 Rg₁ 组

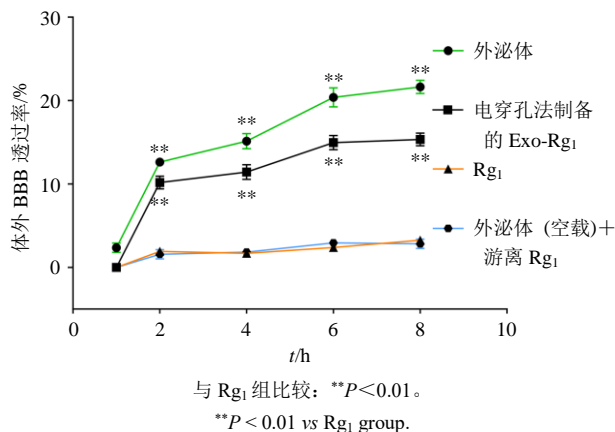


图5 外泌体、Exo-Rg₁、Rg₁ 及外泌体 (空载) + 游离 Rg₁ 体外 BBB 细胞模型透过率 ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)
Fig. 5 Permeability rates of exosome, Exo-Rg₁, free Rg₁, and empty exosome combined with free Rg₁ in *in vitro* BBB cell model ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

($P < 0.01$)，外泌体 (空载) + 游离 Rg₁ 与游离 Rg₁ 组无显著差异，且 4 组透过率都随时间延长而呈增长趋势。

透过效率 = (下室 Rg₁ 浓度 \times 下室体积) / (上室初始 Rg₁ 浓度 \times 上室体积)

2.9 体内动物实验

2.9.1 动物分组、造模及给药 将 60 只小鼠随机分为 6 组：对照组、模型组、外泌体组、Rg₁ 组、Exo-Rg₁ 组和多奈哌齐组，适应性饲养 7 d 后，除对照组外，其余各组均采用 AlCl₃ + D-半乳糖建立 AD 小鼠模型，造模剂量为 AlCl₃ (100 mg/kg) + D-半乳糖 (200 mg/kg)，每日固定时间点 ip 1 次，造模周期持续 4 周。造模成功后，各组分别 iv 0.5 mL 生理盐水、外泌体、游离 Rg₁ 和 Exo-Rg₁，剂量为 20 mg/kg，或 ig 多奈哌齐 (3 mg/kg)，持续 4 周。

2.9.2 Exo-Rg₁ 对 AD 模型小鼠行为学的影响 Morris 水迷宫实验包括定位航行和空间探索实验，持续 7 d。Morris 水迷宫实验中水池被分为 4 个象限，每个象限有不同形状的标记。第 4 象限中心有 1 个直径 10 cm 的圆形透明逃生平台，位于水面下 2 cm 处。适应性训练 1 d，引导小鼠熟悉隐蔽平台并停留 30 s，随后按 60 s 进行 5 d 定位航行实验，每日每只 4 次，记录逃避潜伏期。第 7 天进行空间探索实验，移除平台，记录小鼠在 60 s 内穿越原平台次数和目标象限停留时间。

6 组小鼠定位航行实验结果如表 9 所示，实验第 1 天，各组小鼠逃避潜伏期比较，差异无统计学意义 ($P > 0.05$)，提示各组小鼠基线空间探索能力

表 9 各组小鼠的逃避潜伏期、空间探索能力结果 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 9 Results of escape latency and spatial exploration ability of mice in each group ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/ (mg·mL ⁻¹)	逃避潜伏期时间/s					穿越平台 次数	目标象限停 留时间/s
		1 d	2 d	3 d	4 d	5 d		
对照	-	58.67±0.99	58.24±2.99	37.69±4.36	32.79±1.84	20.93±1.58	9.40±1.35	32.21±1.97
模型	-	59.48±0.63	58.52±1.48	59.70±0.09**	59.78±0.16**	58.73±1.43**	3.05±0.82**	17.03±1.77**
外泌体	20	58.59±1.40	57.87±0.94	48.13±1.24##	43.46±1.84##	44.64±2.12##	4.71±0.95#	19.93±1.14#
Rg ₁	20	57.42±1.35	58.32±1.13	43.70±1.88##	36.63±1.20##	32.45±1.72##	5.95±1.10##	22.40±1.41##
Exo-Rg ₁	20	58.70±1.36	57.08±1.89	40.98±1.12##	32.21±0.75##	28.27±1.75##	7.31±1.06##	26.29±1.18##
多奈哌齐	3	59.99±1.58	59.15±1.21	38.21±1.15##	32.14±1.12##	25.31±1.35##	9.15±0.82##	30.32±1.83##

与对照组比较: ** $P < 0.01$; 与模型组比较: # $P < 0.05$ ## $P < 0.01$; 表 10 同。

** $P < 0.01$ vs control group; # $P < 0.05$ ## $P < 0.01$ vs model group; Same as table 10.

与自主运动能力无明显差异, 实验基线具有一致性。第 3~5 天, 与对照组相比, 模型组小鼠逃避潜伏期显著延长 ($P < 0.01$); 与模型组相比, Rg₁、Exo-Rg₁ 及多奈哌齐组小鼠逃避潜伏期显著缩短 ($P < 0.01$), 其中, Exo-Rg₁ 组的缩短幅度更为明显。

第 7 天撤去平台后, 6 组小鼠空间探索实验结果如表 9 所示, 与对照组相比, 模型组小鼠的平台穿越次数和目标象限停留时间显著减少 ($P < 0.01$); 与模型组相比, Rg₁、Exo-Rg₁ 及多奈哌齐组小鼠的穿越平台次数和目标象限停留时间均显著增加 ($P < 0.05$ 、 0.01), 且 Exo-Rg₁ 组的改善效果更为显著。

2.9.3 Exo-Rg₁ 对 AD 模型小鼠海马 CA3 区病理损伤的影响 取小鼠脑组织后迅速剥离海马体, 用 4%

多聚甲醛固定 24 h, 梯度乙醇 (70%→80%→95%→100%) 脱水, 二甲苯透明, 石蜡包埋并连续切片 (厚度 4 μm)。切片经二甲苯脱蜡、梯度乙醇复水后, 苏木素染色 5 min, 自来水冲洗分化, 1% 盐酸乙醇分化 30 s, 氨水返蓝。随后伊红染色 3 min, 梯度乙醇脱水、二甲苯透明, 中性树脂封片。光学显微镜下观察。结果如图 6 所示, 与对照组相比, 模型组小鼠海马体神经元分散排布, 细胞出现固缩、染色加深, 部分神经元发生凋亡, 且整体排列紊乱无序; 与模型组相比, Rg₁、Exo-Rg₁ 及多奈哌齐组小鼠细胞核固缩的现象有所改善, 染色更加均匀, 神经元结构的完整性有所增强, 且 Exo-Rg₁ 组改善效果最为显著。

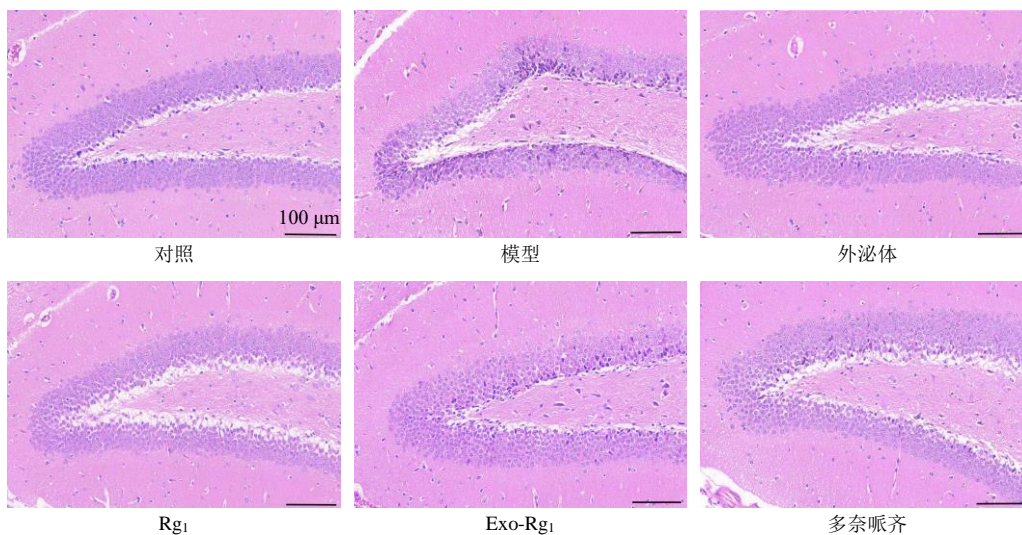


图 6 各组小鼠海马体组织学形态 (HE 染色, ×200)

Fig. 6 Histological morphology of hippocampus in each group of mice (HE staining, ×200)

2.9.4 Exo-Rg₁ 对 AD 模型小鼠海马组织 α7 nAChR、ChAT 蛋白表达的影响 采用 BCA 蛋白检测试剂盒测定脑组织中提取蛋白的蛋白浓度。将样品等量放入十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳中, 转移到

PVDF 膜上, 将 PVDF 膜放入用 TBST Buffer 稀释的 5% 脱脂牛奶, 放入孵育盒, 摇床上轻摇 2 h 进行封闭。剪膜并在 4 °C 下与一抗孵育过夜, 将膜与二抗孵育 2 h。以 β-tubulin 为内参蛋白, 采用 Image J

软件对目的蛋白条带进行灰度分析。结果如图 7 和表 10 所示,与对照组相比,模型组小鼠海马体组织中 ChAT 及 $\alpha 7$ nAChR 蛋白表达均显著降低 ($P < 0.01$);与模型组相比, Rg_1 、Exo- Rg_1 及多奈哌齐组可显著上调小鼠海马体中 ChAT 及 $\alpha 7$ nAChR 蛋白的表达水平 ($P < 0.05$ 、 0.01),且 Exo- Rg_1 组对蛋白表达异常的改善作用更为明显。

2.9.5 Exo- Rg_1 对 AD 模型小鼠海马体组织匀浆中炎症因子水平的影响

取小鼠海马体组织,精密称

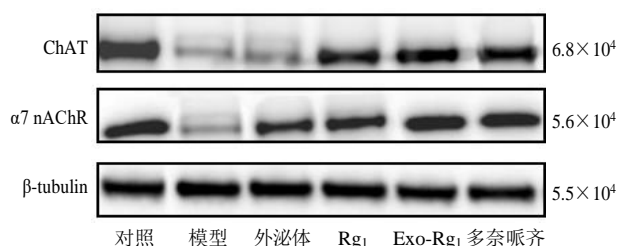


图 7 各组小鼠海马体组织 ChAT、 $\alpha 7$ nAChR 蛋白表达
Fig. 7 Protein expression of ChAT and $\alpha 7$ nAChR in mouse hippocampal tissues of each group

表 10 各组小鼠海马体组织中 ChAT、 $\alpha 7$ nAChR 蛋白相对表达及炎症因子 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 水平 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)
Table 10 Relative protein expression of ChAT and $\alpha 7$ nAChR and levels of inflammatory cytokines IL-1 β , IL-6, and TNF- α in mouse hippocampal tissue of each group ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

组别	剂量/ (mg·mL ⁻¹)	蛋白相对表达水平		炎症因子水平/(pg·mL ⁻¹)		
		ChAT	$\alpha 7$ nAChR	IL-1 β	IL-6	TNF- α
对照	-	1.00 ± 0.17	1.00 ± 0.23	10.36 ± 0.81	11.46 ± 0.65	50.67 ± 4.48
模型	-	0.38 ± 0.13**	0.53 ± 0.17**	60.21 ± 1.64**	78.19 ± 2.16**	168.31 ± 3.47**
外泌体	20	0.43 ± 0.11#	0.61 ± 0.21#	45.23 ± 2.21###	64.65 ± 1.14###	151.21 ± 3.30###
Rg_1	20	0.77 ± 0.14###	0.75 ± 0.16###	37.82 ± 1.74###	41.38 ± 1.61###	110.51 ± 2.61###
Exo- Rg_1	20	0.89 ± 0.07###	0.84 ± 0.14###	22.23 ± 2.17###	31.40 ± 2.68###	80.63 ± 2.82###
多奈哌齐	3	0.95 ± 0.08###	0.89 ± 0.25###	16.69 ± 1.03###	20.89 ± 1.64###	64.96 ± 2.72###

定 0.03 g,经高通量组织研磨仪充分研磨,以 3 000 r/min 转速离心 10 min。收集离心上清液,按体积比 1 : 9 稀释配制为 1%组织匀浆,采用蛋白定量测定试剂盒完成蛋白定量。依据 ELISA 试剂盒操作说明书,测定各组海马体匀浆中 IL-1 β 、IL-6 和 TNF- α 的含量,结果见表 10,与对照组相比,模型组小鼠海马体组织中 IL-1 β 、IL-6 和 TNF- α 含量显著上升 ($P < 0.01$);与模型组相比, Rg_1 、Exo- Rg_1 和多奈哌齐组 IL-1 β 、IL-6 和 TNF- α 含量显著下降 ($P < 0.01$),其中 Exo- Rg_1 组含量下降最为明显。

3 讨论

本研究对比超速离心法、切向流法与双耦合谐波振荡技术 3 种主流纯化方法,结果显示双耦合谐波振荡技术所得外泌体浓度最高、粒径最均一,显著优于超速离心法与切向流法。这一结果与技术原理高度契合:超速离心法依赖密度梯度分离,易因机械力导致外泌体聚集或破裂,且操作耗时长达数小时;切向流法虽能减少机械损伤,但膜截留过程易造成小分子外泌体流失;而双耦合谐波振荡技术通过低频振荡与负压协同作用,在温和条件下实现外泌体的高效捕获,既避免了机械力对膜结构的破坏,又通过纳米芯片的特异性筛选提升了产物均一性^[16-18]。此外,Western blotting 验证显示 3 种方法

提取的外泌体均阳性表达 CD63、CD81、CD9 等标志蛋白,阴性表达内质网蛋白 Calnexin,证明双耦合谐波振荡技术在提升效率的同时,未牺牲外泌体纯度,为后续载药实验奠定了高质量载体基础。首次将双耦合谐波振荡技术应用于外泌体纯化,解决了传统方法效率低、产物不均一的问题,为高质量外泌体的快速制备提供了新方案。

电穿孔法通过瞬时高压在外泌体上形成可逆孔道,实现药物的被动装载,其核心参数直接影响载药效率与载体完整性^[19-21]。本研究在单因素实验基础上,采用 $L_9(3^4)$ 正交试验,方差分析结果显示,脉冲次数与物料比对包封率影响显著,电转电压接近显著,脉冲时间影响不显著。这一结果揭示了电穿孔载药的关键调控规律:脉冲次数通过改变孔道开放频率与持续时间影响药物进入效率——初期增加脉冲次数可显著提升包封率,但超过 5 次后,膜结构反复受损易导致外泌体破裂,反而降低载药稳定性;物料比的影响呈现“饱和效应”,当 Rg_1 质量浓度升至 0.4 mg/mL 时,外泌体内部空间达到装载极限,继续增加药物质量浓度仅提升游离药物比例,导致包封率下降。

最终确定的最优工艺验证包封率达 61.58%,优于传统超声法的 30.12%,证明正交试验在多参数协

同优化中的优势,为电穿孔法介导的外泌体载药提供了可复用的参数筛选思路,为同类中药活性成分的外泌体载药工艺优化提供了参考范式。此外,本研究发现载药后 Exo-Rg₁ 复合物的平均粒径及 PDI 都显著提升,该现象是电穿孔高效载药过程中的常见“伴随效应”,且与 Rg₁ 嵌入脂双层导致膜扩张有关。综合考虑其高达 61.58% 的包封率、显著优于游离药物的跨 BBB 效率 (15.3%) 及体内药效,当前工艺参数下,载药效率的优势在一定程度上弥补了粒径均一性的不足。后续研究将聚焦于工艺优化,寻找“高包封-低 PDI”的平衡点。

BBB 由脑微血管内皮细胞、星形胶质细胞足突及基底膜构成,其紧密连接结构,严格限制大分子与亲水性药物的透过,是脑部药物递送中的主要屏障^[22-24]。游离 Rg₁ 作为亲水性皂苷 ($\lg P \approx 1.2$),难以通过 BBB 的脂质双层结构,且易被脑微血管内皮细胞的外排泵(如 P-糖蛋白)识别并排出^[6]。本研究采用 bEnd.3 细胞构建体外 BBB 模型,TEER 测定、液面渗透及荧光素钠渗透实验,证明模型具备完整的屏障功能^[25]。

透过实验结果显示,8 h 实验组 (Exo-Rg₁ 复合物) 透过效率低于外泌体组,原因可能是 Rg₁ 嵌入脂质双分子层导致膜流动性降低及表面电荷改变,削弱外泌体与 bEnd.3 细胞的初始黏附与融合效率,并且嵌入的药物分子可能对表面功能蛋白(如 CD63、CD81 等)形成空间遮蔽效应,载药后粒径增大及 PDI 升高提示存在聚集现象,增加了细胞旁路转运的难度^[26-28];但 Exo-Rg₁ 组 (15.3%) 的透过效率仍显著高于游离 Rg₁ 组 (3.3%),透过效率提升约 4.6 倍,外泌体(空载)+游离 Rg₁ 与游离 Rg₁ 组无显著差异,证明 Rg₁ 必须被外泌体包封才能实现高效跨膜,这一提升效果与外泌体的天然递送优势密切相关,为中药活性成分的脑部递送提供了新的技术路径。然而,HPLC 法仅能检测下室 Rg₁ 总量,无法区分 Rg₁ 是以包封形式随完整外泌体跨膜,还是释放后以游离形式透过。后续研究将采用荧光标记外泌体(如 DiD-Exo-Rg₁),结合共聚焦显微镜和 NTA-荧光联用技术,可视化追踪外泌体跨膜过程及胞内命运,为外泌体介导的药物递送机制提供更直观的证据。

动物实验结果显示,AlCl₃+D-半乳糖诱导的 AD 模型小鼠出现明显认知障碍、海马神经元损伤、胆碱能系统功能失调及炎症因子升高,而 Exo-Rg₁

复合物能显著缩短小鼠水迷宫逃避潜伏期,增加目标象限停留时间与平台穿越次数;改善海马 CA3 区神经元排列紊乱与固缩现象;上调 ChAT 及 $\alpha 7$ nAChR 蛋白表达,修复“ChAT→乙酰胆碱→ $\alpha 7$ nAChR”信号链功能;降低海马体组织中 TNF- α 、IL-1 β 及 IL-6 等炎症因子水平,且效果优于游离 Rg₁ 组与单外泌体组。

综上所述,体内外数据相互印证,共同支持外泌体可有效提升 Rg₁ 跨越 BBB 效率,为脑部疾病治疗提供实验依据。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Ballabh P, Braun A, Nedergaard M. The blood-brain barrier: An overview structure, regulation, and clinical implications [J]. *Neurobiol Dis*, 2004, 16(1): 1-13.
- [2] Zhao Y H, Liu N W, Ke C C, et al. Combined treatment of sodium ferulate, *n*-butylidenephthalide, and ADSCs rehabilitates neurovascular unit in rats after photothrombotic stroke [J]. *J Cell Mol Med*, 2019, 23(1): 126-142.
- [3] 王维刚,林瑶,巨佳,等.人参皂苷神经保护作用研究进展 [J]. *解放军药学学报*, 2024, 37(6): 591-600.
- [4] 杨岩涛,赵佳柱,肖佳妹,等.人参皂苷治疗阿尔茨海默病的药理作用研究进展 [J]. *中国药理学通报*, 2021, 37(12): 1638-1643.
- [5] Yang S J, Wang J J, Cheng P, et al. Ginsenoside Rg₁ in neurological diseases: From bench to bedside [J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2023, 44(5): 913-930.
- [6] Wei W L, Li Z W, Li H, et al. Exploration of tissue distribution of ginsenoside Rg₁ by LC-MS/MS and nanospray desorption electrospray ionization mass spectrometry [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2021, 198: 113999.
- [7] Lai J J, Chau Z L, Chen S Y, et al. Exosome processing and characterization approaches for research and technology development [J]. *Adv Sci*, 2022, 9(15): 2103222.
- [8] Doyle L M, Wang M Z. Overview of extracellular vesicles, their origin, composition, purpose, and methods for exosome isolation and analysis [J]. *Cells*, 2019, 8(7): 727.
- [9] Kibria G, Ramos E K, Wan Y, et al. Exosomes as a drug delivery system in cancer therapy: Potential and challenges [J]. *Mol Pharmaceutics*, 2018, 15(9): 3625-3633.
- [10] 卓岩.基于膜融合策略的工程化牛奶外泌体设计及其用于 siRNA 高效递送的研究 [D].南昌:南昌大学, 2024.

- [11] Shao J T, Zaro J, Shen Y X. Advances in exosome-based drug delivery and tumor targeting: From tissue distribution to intracellular fate [J]. *Int J Nanomed*, 2020, 15: 9355-9371.
- [12] Kim T, Hong J W, Lee L P. Efficient methods of isolation and purification of extracellular vesicles [J]. *Nano Convergence*, 2025, 12(1): 45.
- [13] Chen Y C, Zhu Q F, Cheng L M, *et al.* Exosome detection via the ultrafast-isolation system: Exodus [J]. *Nat Meth*, 2021, 18(2): 212-218.
- [14] Auquierè M, Muccioli G G, des Rieux A. Methods and challenges in purifying drug-loaded extracellular vesicles [J]. *J Extracell Vesicles*, 2025, 14(6): e70097.
- [15] 闫洁, 常恬, 章竟, 等. 用于炎症治疗的磷脂酰丝氨酸修饰胞外囊泡纳米递药系统的初步构建与评价 [J]. *江苏大学学报: 医学版*, 2024, 34(1): 79-84.
- [16] Shen J N, Ma Z T, Xu J Q, *et al.* Exosome isolation and detection: From microfluidic chips to nanoplasmonic biosensor [J]. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2024, 16(18): 22776-22793.
- [17] Yang D B, Zhang W H, Zhang H Y, *et al.* Progress, opportunity, and perspective on exosome isolation-efforts for efficient exosome-based theranostics [J]. *Theranostics*, 2020, 10(8): 3684-3707.
- [18] Chen P, Ruan A M, Zhou J, *et al.* Extraction and identification of synovial tissue-derived exosomes by different separation techniques [J]. *J Orthop Surg Res*, 2020, 15(1): 97.
- [19] Ahmed R, Sayegh N, Graciotti M, *et al.* Electroporation as a method of choice to generate genetically modified dendritic cell cancer vaccines [J]. *Curr Opin Biotechnol*, 2020, 65: 142-155.
- [20] Kamerkar S, LeBleu V S, Sugimoto H, *et al.* Exosomes facilitate therapeutic targeting of oncogenic KRAS in pancreatic cancer [J]. *Nature*, 2017, 546(7659): 498-503.
- [21] 高舒颖, 梁爽, 刘永军, 等. 外泌体在基因递送系统中的研究进展 [J]. *中国医药工业杂志*, 2023, 54(3): 295-303.
- [22] 赵燕, 王强, 王萃, 等. 舒芬太尼调节 GAS6/Axl 信号通路对高血压性脑出血大鼠血脑屏障和神经损伤的影响 [J]. *免疫学杂志*, 2024, 40(7): 581-586.
- [23] Morofuji Y, Nakagawa S. Drug development for central nervous system diseases using *in vitro* blood-brain barrier models and drug repositioning [J]. *Curr Pharm Des*, 2020, 26(13): 1466-1485.
- [24] Abbott N J, Patabendige A A K, Dolman D E M, *et al.* Structure and function of the blood-brain barrier [J]. *Neurobiol Dis*, 2010, 37(1): 13-25.
- [25] 王伯松, 郭安臣, 王群. 体外血脑屏障模型的研究进展及其在新药研发中的作用 [J]. *中国医药指南*, 2019, 17(14): 54-58.
- [26] Paba C, Dorigo V, Senigagliaesi B, *et al.* Lipid bilayer fluidity and degree of order regulates small EVs adsorption on model cell membrane [J]. *J Colloid Interface Sci*, 2023, 652(Pt B): 1937-1943.
- [27] Midekessa G, Godakumara K, Ord J, *et al.* Zeta potential of extracellular vesicles: Toward understanding the attributes that determine colloidal stability [J]. *ACS Omega*, 2020, 5(27): 16701-16710.
- [28] Sakai-Kato K, Hidaka M, Un K, *et al.* Physicochemical properties and *in vitro* intestinal permeability properties and intestinal cell toxicity of silica particles, performed in simulated gastrointestinal fluids [J]. *Biochim Biophys Acta BBA Gen Subj*, 2014, 1840(3): 1171-1180.

[责任编辑 郑礼胜]