

巨噬细胞膜包被的黄芩苷脂质体改善小鼠全脑缺血再灌注损伤的药效与机制研究

冯慧意¹, 龙 宇¹, 张羽璐^{2*}, 李 楠^{1*}

1. 成都中医药大学药学院, 西南特色中药资源国家重点实验室, 四川 成都 611130

2. 重庆市江北区中医院 药剂科, 重庆 400000

摘要: 目的 探究巨噬细胞膜包被的黄芩苷脂质体 (macrophage membrane-coated baicalin liposomes, MM-BA-LP) 的血清稳定性、免疫逃逸及脑靶向性, 以及其对小鼠脑全缺血再灌注损伤 (global cerebral ischemia-reperfusion injury, GCIRI) 的保护作用。方法 通过吸光度分析 MM-BA-LP 血清稳定性; 利用荧光显微镜和流式细胞仪评估 MM-BA-LP 的免疫逃逸能力; 使用活体成像系统研究 MM-BA-LP 在脑组织中的分布; 通过 CCK-8 法确定安全给药范围; 构建细胞氧糖剥夺/再灌注 (oxygen glucose deprivation/reperfusion, OGD/R) 模型和小鼠 GCIRI 模型, 进行神经功能评分、旷场实验、苏木素-伊红 (hematoxylin-eosin) 染色以评价药效, 并通过 ELISA 和 Western blotting 实验进行抗炎机制研究。结果 MM-BA-LP 具有良好的血清稳定性; 活体成像结果显示, MM-BA-LP 组脑部荧光强度高于 BA-LP 组; CCK-8 实验结果显示, MM-BA-LP 对 BV2 细胞的毒性低于 BA-LP; 药效结果显示, MM-BA-LP 显著改善 GCIRI 小鼠的运动和神经功能 ($P < 0.001$), 且能显著改善脑组织炎症性病变; 机制研究结果显示, MM-BA-LP 能显著降低 OGD/R 细胞与 GCIRI 小鼠脑组织中高迁移率族蛋白 B1 (high mobility group box 1 protein, HMGB1)、Toll 样受体 4 (Toll-like receptor 4, TLR4) 和磷酸化核因子- κ B (phosphorylated nuclear factor- κ B, p-NF- κ B)/NF- κ B 的表达 ($P < 0.05$ 、 0.01 、 0.001), 且能显著下调炎症因子白细胞介素-6 (interleukin-6, IL-6)、白细胞介素-1 β 、肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α) 的水平 ($P < 0.05$ 、 0.01 、 0.001); 且 HMGB1 特异性抑制剂甘草酸与 MM-BA-LP 联用能显著改善 GCIRI 小鼠脑组织炎症性病变。结论 MM-BA-LP 具有良好的稳定性、免疫逃逸能力和脑靶向性, 能显著抑制 GCIRI 后的炎症反应和神经功能损伤, 其机制可能涉及 HMGB1/TLR4/NF- κ B 通路。

关键词: 巨噬细胞膜; 黄芩苷脂质体; 脑靶向; 全脑缺血再灌注损伤; 炎症反应; HMGB1

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2025)17-6231-11

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2025.17.013

Efficacy and mechanism of macrophage membrane-coated baicalin liposomes in improving global brain ischemia-reperfusion injury in mice

FENG Huiyi¹, LONG Yu¹, ZHANG Yulu², LI Nan¹

1. State Key Laboratory of Southwest Chinese Medicine Resources, School of Pharmacy, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 611130, China

2. Department of Pharmacy, Jiangbei District Hospital of Traditional Chinese Medicine, Chongqing 400000, China

Abstract: Objective To investigate the serum stability, immune evasion and brain targeting of macrophage membrane-coated baicalin liposomes (MM-BA-LP), and study its protective effect on global cerebral ischemia-reperfusion injury (GCIRI) in mice. **Methods** The serum stability of MM-BA-LP was analyzed by absorbance; Fluorescence microscopy and flow cytometry were used to assess immune evasion of MM-BA-LP; The distribution of MM-BA-LP in brain tissue was studied using a *in vivo* bioluminescence imaging; The safe dosing range was determined by CCK-8 method; Oxygen glucose deprivation/reperfusion (OGD/R) model and mice GCIRI model were constructed, neurological severity score, open field experiments and hematoxylin-eosin (HE) staining were performed to evaluate drug efficacy, and the anti-inflammatory mechanism was studied by ELISA and Western blotting. **Results** MM-BA-LP had

收稿日期: 2025-04-30

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (82474220)

作者简介: 冯慧意 (2001—), 女, 硕士研究生, 从事中药新剂型研究。E-mail: 1790137563@qq.com

*通信作者: 李 楠 (1981—), 女, 教授, 硕士生导师, 从事生物药剂学与药理学研究。E-mail: 55743198@qq.com

张羽璐 (1996—), 女, 中药师, 从事中药新剂型研究。E-mail: 1215238558@qq.com

good serum stability. The results of *in vivo* imaging showed that the fluorescence intensity of MM-BA-LP group was higher than that of BA-LP group. The results of CCK-8 experiments showed that the toxicity of MM-BA-LP to BV2 cells was lower than that of BA-LP. The efficacy results showed that MM-BA-LP significantly improved the motor and nerve function of GCIRI mice ($P < 0.001$), and significantly improved the inflammatory lesions of brain tissue. Mechanistic studies showed that MM-BA-LP significantly reduced the expressions of high mobility group box 1 protein (HMGB1), Toll-like receptor 4 (TLR4) and phosphorylated nuclear factor- κ B (p-NF- κ B)/NF- κ B in OGD/R cells and brain tissues of GCIRI mice ($P < 0.05, 0.01, 0.001$), and significantly down-regulated the levels of inflammatory cytokines such as interleukin-6 (IL-6), IL-1 β and tumor necrosis factor- α (TNF- α) ($P < 0.05, 0.01, 0.001$). In addition, the combination of HMGB1 specifically inhibitor glycyrrhizic acid and MM-BA-LP significantly improved the inflammatory lesions of brain tissue in GCIRI mice. **Conclusion** MM-BA-LP has good serum stability, immune escape ability and brain targeting, and could significantly inhibit the inflammatory response and neurological impairment after GCIRI, and the mechanism may involve HMGB1/TLR4/NF- κ B pathway.

Key words: macrophage membrane; baicalin liposomes; brain targeting; global cerebral ischemia-reperfusion injury; inflammatory response; HMGB1

脑缺血性疾病如脑梗死、短暂性脑缺血发作等是临床上的常见疾病，具有高发病率、高致残率和高死亡率的特点^[1-2]。尽管早期恢复血流是治疗缺血性脑损伤的关键措施，但缺血后的再灌注过程往往会引发再灌注区域发生严重的炎症反应，导致脑组织的进一步损伤，即脑缺血再灌注损伤^[3]。这一过程在脑卒中（溶栓或取栓）和心脏骤停复苏后的治疗中尤为关键，然而目前大部分研究均关注于局灶性缺血再灌注，对于全脑缺血再灌注损伤（global cerebral ischemia-reperfusion injury, GCIRI）的研究较少^[4]。药物也因无法穿过血脑屏障（blood-brain barrier, BBB）难以实现靶向递送^[5]。

细胞膜生物纳米粒子的出现为脑缺血再灌注损伤药物开发和疾病治疗提供了一种新策略。作为一种新的伪装技术，这些生物纳米粒子在细胞膜表面保留了最大量的功能蛋白，并具有所属细胞的相关生物学特性^[6]。巨噬细胞是炎症的主要效应细胞，用巨噬细胞膜（macrophage membrane, MM）修饰的纳米载体通常具有延长循环、识别抗原以增强靶向、逃避免疫清除和逐渐释放以降低毒性等特征^[7]。研究发现，单核巨噬细胞可以通过透析改变形状，并具有天然穿越 BBB 的能力^[8-9]。卒中后，大脑中的驻留免疫细胞（包括巨噬细胞）也被激活，招募并允许循环免疫细胞渗透到缺血病灶区域^[10]。提示巨噬细胞可以增强药物递送系统跨越 BBB 的能力，从而在脑组织实现药物的高度富集。黄芩苷是黄芩的提取物，具有抗炎和抗氧化药理活性^[11]，能够改善脑缺血再灌注损伤。但黄芩苷存在生物利用度低的问题，本课题组前期制备了 MM 包封的黄芩苷脂质体（baicalin liposomes, BA-LP）^[12]，以提高药物

的生物利用度和脑靶向性。

研究发现，脑缺血再灌注损伤的机制包括活性氧的产生、炎症细胞因子的表达、炎症级联反应等^[13]。大量代谢物在脑部积累，引发微循环障碍，对胶质细胞和神经元造成严重损害。高迁移率族蛋白 B1（high mobility group box 1 protein, HMGB1）是经典的促炎介质，在炎症发病机制中起核心作用^[14]。研究表明，缺血时释放的 HMGB1，能激活小胶质细胞和星形胶质细胞，且血液中 HMGB1 的浓度与卒中的严重程度和预后密切相关^[15]。将 HMGB1 作为炎症性疾病治疗靶点，开发抑制 HMGB1 的药物可能有助于减轻 GCIRI 后脑组织炎症，从而发挥治疗作用。而 HMGB1 主要通过 Toll 样受体 4（Toll-like receptor 4, TLR4）结合发挥其生物学特性，上调下游信号和核因子- κ B（nuclear factor- κ B, NF- κ B）的表达，并促进白细胞介素-1 β （interleukin-1 β , IL-1 β ）、IL-6、肿瘤坏死因子- α （tumor necrosis factor- α , TNF- α ）^[16]等炎症因子的释放，最终介导神经炎症反应和损伤。研究表明，炎症状态下，TLR4 在 MM 表面活跃，并与 HMGB1 结合参与炎症反应^[17-18]。且黄芩苷促进小胶质细胞从促炎 M1 型向抗炎 M2 型极化，减少 HMGB1 等炎症介质的分泌，并通过抑制 TLR4/NF- κ B 通路减少促炎因子的释放，从而阻断 HMGB1 介导的炎症反应^[19-20]。因此，本研究基于 HMGB1/TLR4/NF- κ B 通路探究 MM-BA-LP 对小鼠 GCIRI 的保护作用。

1 材料

1.1 细胞与动物

RAW264.7 细胞来自中国科学院细胞库，BV2 细胞由武汉普诺赛生命科技有限公司提供。细胞用

含 10% 胎牛血清 (fetal bovine serum, FBS) 和 1% 青霉素-链霉素的 DMEM 培养基, 于 37 °C、95% O₂ 和 5% CO₂ 的培养箱中培养。

SPF 级雄性 KM 小鼠, 体质量 27~30 g, 6~8 周龄, 由达硕实验动物有限公司提供, 合格证号 SCXK (京) 2024-0001。动物实验获得成都中医药大学动物护理与使用委员会的批准 (批准号 2024199)

1.2 药品与试剂

黄芩苷 (批号 A25HS192344, 质量分数 ≥ 90%) 购自上海源叶生物科技有限公司; 胆固醇 (批号 B80859)、大豆卵磷脂 (批号 SY-S1-190601) 购自上海艾韦特医药科技有限公司; FITC (批号 230916)、DiI (批号 C12210335) 购自上海麦克林生化科技有限公司; 青霉素-链霉素混合物 (批号 23285738) 购自武汉博士德生物工程有限公司; 高糖 DMEM 培养基 (批号 GA24080043613)、无糖 DMEM 培养基 (批号 GP24050210060)、 β -actin 抗体 (批号 AC231112001)、HMGB1 抗体 (批号 R12061936)、TLR4 抗体 (批号 GB11519)、NF- κ B 抗体 (批号 AC240322036)、Histone H3 抗体 (批号 AC241121312)、HRP 标记山羊抗兔二抗 (批号 M210035) 购自武汉赛维尔生物科技有限公司; FBS (批号 24020705) 购自杭州四季青生物工程材料有限公司; BCA 蛋白测定试剂盒 (批号 23326620) 购自上海碧云天生物科技公司; DiR (批号 RJ0230604) 购自西安瑞禧生物科技有限公司; HRP 标记的山羊抗小鼠二抗 (批号 10079167) 购自上海艾博抗贸易有限公司; 二甲基亚砜 (dimethyl sulfoxide, DMSO, 批号 23289712, 质量分数 ≥ 99.5%) 购自北京兰杰柯科技有限公司; 甘草酸 (批号 LM60W10, 质量分数 ≥ 98%) 购自北京百灵威科技有限公司; IL-1 β ELISA 试剂盒 (批号 WZ0588XV4377)、IL-6 ELISA 试剂盒 (批号 VVZ0468401428)、TNF- α ELISA 试剂盒 (批号 WZ03446R0223) 购自武汉伊莱瑞特生物科技股份有限公司; p-NF- κ B 抗体 (批号 P22MY7P) 购自成都正能生物技术有限责任公司。

1.3 仪器

YMNL-IIYJ 型超声细胞破碎仪 (南京以马内利仪器设备有限公司); SpectraMax iD5 型酶标仪 (英国柏栢有限公司); SP8 SR 型激光共聚焦显微镜 (德国徕卡仪器有限公司); FACSCanto II 型流式细胞仪 (美国 BD 医疗器械有限公司); SpectraMax iD5

型荧光酶标仪 (上海美谷分子仪器有限公司); PEIVIS 小动物活体成像仪 (珀金埃尔默企业管理有限公司); PowerPac Basic 电泳仪、MiniTrans-Blot Cell 垂直电泳槽及组件、MiniTrans-Blot Cell 转印槽及组件 (伯乐生命医学产品公司); ChemiScope 6100 型化学发光成像系统 (上海勤翔科学仪器有限公司); NanoZoomer S60 型病理切片扫描仪 (滨松光子学商贸有限公司)。

2 方法

2.1 MM-BA-LP 的制备

在前期研究中, 本课题组制备了具有良好粒径和储存稳定性的 MM-BA-LP^[12]。35 mg 胆固醇和 200 mg 大豆卵磷脂完全溶解于氯仿-乙醚 (1:2) 的混合液中, 形成有机相, 将黄芩苷均匀分散在有机相中 (5.2 mg/mL)。将混合物置于超声均质器 (20 °C、10 min) 中, 形成乳白色溶液。通过旋转蒸发去除有机溶剂后, 加入 1 mL 磷酸盐缓冲液 (phosphate buffer saline, PBS) 进行水化, 得到淡黄色的 BA-LP 溶液。

RAW264.7 细胞融合度为 80% 时收集细胞, 用无菌 PBS 溶液洗涤 2~3 次, 离心后用含蛋白酶抑制剂的 TM buffer 重悬、吹散。用超声波细胞破碎仪破碎细胞, 加入 1 mol/L 蔗糖溶液混合, 调整蔗糖浓度至 0.25 mol/L。于冷冻离心机 4 °C、3 000 r/min 离心 10 min, 吸取上清液, 4 °C、4 500 r/min 离心 30 min, 收集沉淀得 MM。用适量 0.2 mol/L 蔗糖溶液洗涤 MM, 4 °C、4 500 r/min 离心 30 min, 用 TM buffer 洗涤沉淀, 再次离心收集沉淀得纯化 MM。采用 BCA 蛋白试剂盒对纯化后的 MM 蛋白质进行定量测定, 纯化的 MM 置于超声波细胞破碎仪中, 获得 MM 囊泡。将 MM 囊泡与 BA-LP 混合均匀 (以每毫升 MM-BA-LP 含 0.4 mg 蛋白计), 多次穿过 400 nm 和 200 nm 的聚碳酸酯膜, 获得 MM-BA-LP。

2.2 MM-BA-LP 血清稳定性研究

分别取等量 BA-LP、MM-BA-LP, 按 1:1 的比例与 FBS 溶液混合, 于 37 °C 环境下孵育, 以含 50% FBS 的 PBS 缓冲液作为阴性对照组, 每组重复 3 次。分别于 0.5、1、2、4、8、12、24 h 吸取 100 μ L 样本加入 96 孔板中, 设定酶标仪的波长为 560 nm, 测定样本的吸光度 (*A*) 值。

2.3 MM-BA-LP 免疫逃逸功能研究

RAW264.7 细胞以 8×10^4 个/孔接种于 12 孔板

中,培养 24 h 后,向培养基中加入 FITC-LP 和 MM-FITC-LP,并以空白脂质体作为阴性对照, FITC 最终浓度为 10 $\mu\text{mol/L}$ 。孵育 6 h 后,用 PBS 洗涤细胞 3 次并重悬于 500 μL PBS 中,通过流式细胞术定量评估样品的荧光强度。将孵育 6 h 后的细胞,用 4%多聚甲醛于室温下固定 15 min,并在暗处用 DiI 染色 15 min。使用激光共聚焦显微镜观察摄取情况。

2.4 小动物活体成像研究 MM-BA-LP 的脑靶向性

2.4.1 GCIRI 模型建立 参考令狐艳等^[21]的双侧颈总动脉夹闭法并稍作修改,对小鼠建立 GCIRI 模型。小鼠 ip 1%戊巴比妥钠麻醉,颈部消毒后,分离两侧颈总动脉并用非侵入性动脉夹钳夹闭。阻断 20 min 后,释放动脉夹钳以恢复脑部血供 10 min,重复 3 次,第 3 次松开动脉夹钳后不再夹闭,最后缝合伤口并消毒。对照组除颈总动脉未夹闭外,其余操作均与模型组相同。

2.4.2 体内药物分布可视化 小鼠分为正常组和模型组,使用 DiR 作为荧光探针并将其包装到脂质体中,各组尾 iv DiR-LP 和 MM-DiR-LP。小鼠用异氟醚麻醉,并使用体内成像系统在 0.5、1、2、6、12、24 h 检测脑部的荧光信号,取血后,处死小鼠,取出脑组织进行荧光成像。

2.5 改良神经功能评分 (Mahmood's method neurological severity score, mNSS) 和旷场实验评价小鼠神经功能

设置对照组、模型组、MM-BA-LP 组(尾 iv MM-BA-LP 50 mg/kg)和 BA-LP 组(尾 iv BA-LP 50 mg/kg),每组 8 只。建立 GCIRI 模型后,每 24 小时给药 1 次,连续给药 48 h。造模 14 d 后,采用 mNSS 评估小鼠运动功能、感觉功能、反射。将小鼠放入旷场箱(40 cm $\times$ 40 cm $\times$ 40 cm)正中间,记录 5 min 内小鼠的活动情况,运用旷场行为学分析软件分析小鼠运动总距离、平均速度和静止时间,评价小鼠评估自主运动能力。

2.6 苏木素-伊红(hematoxylin-eosin, HE)染色评价脑组织炎症反应

按照小鼠脑组织用 4%多聚甲醛固定,脱水、包埋并切片,经脱蜡处理后进行 HE 染色。使用病理切片扫描仪扫描切片,观察各组小鼠脑组织炎症细胞浸润及细胞存活情况,并拍照。

2.7 体外机制研究

2.7.1 CCK-8 实验确定安全给药浓度 将 BV2 细

胞以 2×10^4 个/孔接种到 96 孔板中,培养过夜。分别加入不同浓度(0、1、5、10、20、50、100、200 $\mu\text{g/mL}$)的 BA-LP 和 MM-BA-LP(给药溶液经无菌 0.22 μm 微孔滤膜滤过)处理 24 h。每孔加入 CCK-8 溶液 10 μL ,在 37 $^{\circ}\text{C}$ 下孵育 24 h 后,采用酶标仪测定 450 nm 处的 A 值。

2.7.2 OGD/R 模型的建立及给药 BV2 细胞进行氧糖剥夺/再灌注(oxygen glucose deprivation/reperfusion, OGD/R)处理,体外模拟 GCIRI 损伤。设置对照组、模型组、MM-BA-LP 组和 BA-LP 组,除对照组外,其余细胞用含 10% FBS 的无糖 DMEM 培养基在厌氧室(1% O_2 、94% N_2 、5% CO_2)中培养,缺氧 3 h 后将 DMEM 无糖培养基替换为完全培养基,转移至恒温恒氧培养箱,进行复氧培养 24 h,复氧时给予药物干预。

2.7.3 Western blotting 检测 HMGB1/TLR4/NF- κB 通路相关蛋白表达 收集“2.7.2”项下细胞,用含蛋白酶抑制剂的 RIPA 裂解缓冲液裂解后,采用 BCA 法测定蛋白浓度。蛋白样品经 10%十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳,转至 PVDF 膜,于 5% 牛血清白蛋白中封闭 2 h,加入一抗 HMGB1(1:1 000)、TLR4(1:1 000)、NF- κB (1:1 000)和 β -actin(1:5 000),4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜。TBST 洗涤 3 次,加入二抗,室温下孵育 1.5 h,洗涤后,通过增强化学发光显影,并用 Image J 软件进行定量分析。

2.7.4 ELISA 法测定炎症因子水平 收集各组细胞上清液,采用 ELISA 试剂盒测定 IL-1 β 、IL-6 和 TNF- α 水平。

2.8 体内机制研究

2.8.1 Western blotting 检测小鼠脑组织 HMGB1/TLR4/NF- κB 通路相关蛋白表达 小鼠随机分为对照组、模型组、MM-BA-LP 组(尾 iv MM-BA-LP 50 mg/kg)和 BA-LP 组(尾 iv BA-LP 50 mg/kg),每组 3 只。建立 GCIRI 模型后,每 24 小时给药 1 次,48 h 后,处死小鼠,取出脑组织,匀浆后加入裂解液提取总蛋白,并采用 BCA 法测定蛋白浓度。按“2.7.3”项下方法测定各组小鼠脑组织 HMGB1、TLR4 和 p-NF- κB /NF- κB 的蛋白表达水平。

2.8.2 ELISA 法测定炎症因子水平 各组小鼠脑组织称定质量后,用预冷 PBS 缓冲液制备成 10%脑组织匀浆,离心后收集上清液并低温保存。采用 ELISA 试剂盒测定 IL-1 β 、IL-6 和 TNF- α 水平。

2.9 HE 染色和 ELISA 实验对 MM-BA-LP 抗炎机制进行逆向验证

将小鼠分为对照组、模型组、甘草酸(50 mg/kg)组和甘草酸(50 mg/kg)+MM-BA-LP(50 mg/kg)组,每组 9 只。建立 GCIRI 模型后,各给药组每 24 小时 ip 相应药物。48 h 后,处死小鼠,取出脑组织,按“2.6”项下方法进行 HE 染色,按“2.8.2”项下方法进行 ELISA 检测,观察特异性抑制 HMGB1 后 GCIRI 小鼠脑组织炎症病变以及炎症因子(TNF- α 、IL-1 β 、IL-6)水平,从而验证 MM-BA-LP 是否通过抑制 HMGB1 及其激活的 TLR4/NF- κ B 通路从而改善小鼠 GCIRI。

2.10 统计学分析

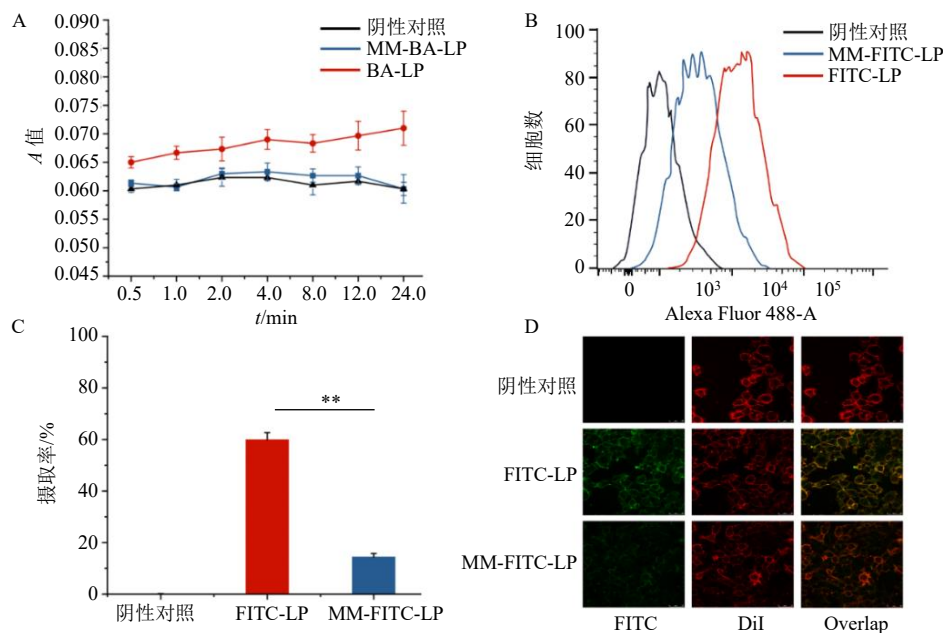
使用 Graphpad prism 9.0 软件进行统计分析,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。组间差异通过单因素方差分析(ANOVA)评估。

3 结果

3.1 MM-BA-LP 的血清稳定性与免疫逃逸功能

当脂质体与血清共存时,容易与血清蛋白形成一层称为“蛋白冠”的物质,对其在体内的稳定性有显著影响^[22],当脂质体与血清蛋白结合后,可以改变光的散射,使得 A 值变大。为了评估制备的

MM-BA-LP 在血清中的稳定性,分别检测了 BA-LP 和 MM-BA-LP 与血清共孵育后在 560 nm 处的 A 值变化。如图 1-A 所示,24 h 内,MM-BA-LP 组 A 值与阴性对照组无显著差异,且 A 值变化范围始终小于 BA-LP 组。免疫逃逸验证是评估药物递送系统性能的关键指标,网状内皮系统的巨噬细胞能识别并清除外源物质,预期 MM-BA-LP 将继承 MM 的抗吞噬能力,其表面的膜成分有助于脂质体在体内的存在^[23]。使用 FITC 染料标记脂质载体,通过流式细胞术量化脂质体的内化百分比,结果如图 1-B、C 所示,巨噬细胞对 FITC-LP 和 MM-FITC-LP 的摄取率分别为 $(59.9 \pm 2.8)\%$ 和 $(14.4 \pm 1.4)\%$,MM-FITC-LP 组的细胞摄取率显著低于 FITC-LP 组($P < 0.01$),说明 MM 修饰的脂质体减少了巨噬细胞的摄取。共聚焦激光扫描显微镜图像结果如图 1-D 所示,FITC-LP 组的绿色荧光(摄取脂质体后的细胞)大部分与细胞膜的红色荧光重叠,表明巨噬细胞能显著摄取 FITC-LP;而 MM-FITC-LP 组的绿色荧光与细胞膜重叠比例显著降低,表明其在细胞中的富集减少。结果表明,MM 包被有效阻止了脂质体与血清蛋白的结合,提高了 BA-LP 的血清稳定性,且能有效抑制巨噬细胞摄取,达到免疫逃逸目的。



A-不同时间点脂质体在血清中的 A 值变化; B、C-通过流式细胞术鉴定 RAW264.7 细胞对 MM-FITC-LP 与 FITC-LP 的摄取情况; D-激光共聚焦显微镜观察 RAW264.7 细胞对 MM-FITC-LP 与 FITC-LP 的摄取情况; ** $P < 0.01$ 。

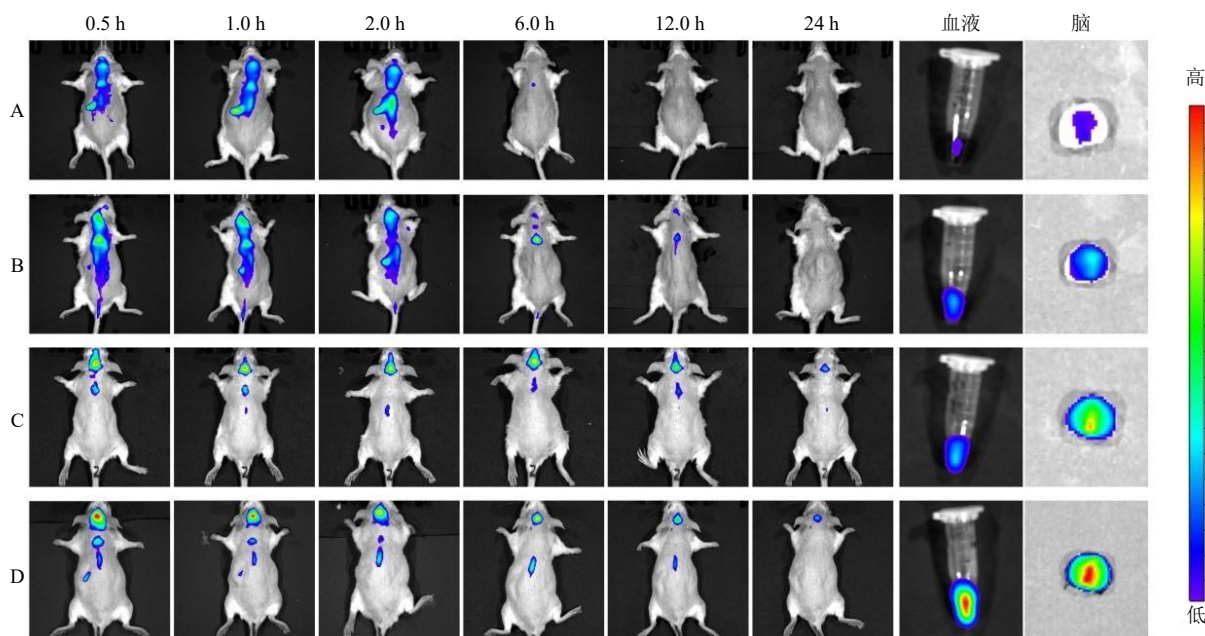
A-changes in absorbance of liposomes in serum at different time points; B, C-uptake of MM-FITC-LP and FITC-LP by RAW264.7 cells identified by flow cytometry; D-uptake of MM-FITC-LP and FITC-LP by RAW264.7 cells observed by laser confocal microscopy; ** $P < 0.01$.

图 1 血清稳定性及细胞摄取结果
Fig. 1 Serum stability and cell uptake results

3.2 MM-BA-LP 的脑靶向性

为研究 MM 包被脂质体是否能携带更多药物穿过 BBB 靶向到大脑, 采用荧光实时成像技术监测脂质体生物分布。小鼠尾 iv DiR-LP 和 MM-DiR-LP, 在不同时间点进行活体荧光成像。结果如图 2 所示, 无论是正常小鼠还是 GCIRI 小鼠, MM-DiR-LP 在大脑中富集程度更高, 且模型组荧光信号强于正常组, 而 DiR-LP 在大脑中的积累较少, 说明 MM

包被能增加药物的入脑量, 提高脑靶向性。相较于 DiR-LP, MM-DiR-LP 在血液中保持强荧光, 使药物在体内长时间循环, 表明 MM 包被可抵抗免疫清除, 延长药物半衰期, 且 MM-DiR-LP 在脑组织中荧光强烈, 模型组高于正常组, 与体内荧光成像结果一致。以上结果说明, MM-DiR-LP 不仅能穿过 BBB 招募至大脑, 还能延长药物在脑内的停留时间, 使药物更容易在病灶部位富集。



A-正常小鼠 DiR-LP 给药组; B-正常小鼠 MM-DiR-LP 给药组; C-模型小鼠 DiR-LP 给药组; D-模型小鼠 MM-DiR-LP 给药组。

A-DiR-LP dosing group in normal mice; B-MM-DiR-LP dosing group in normal mice; C-DiR-LP dosing group in model mice; D-MM-DiR-LP dosing group in model mice.

图 2 正常小鼠和模型小鼠体内荧光成像及血液和脑组织荧光成像结果

Fig. 2 *In vivo* fluorescence imaging and blood and brain tissue fluorescence imaging results in normal mice and model mice

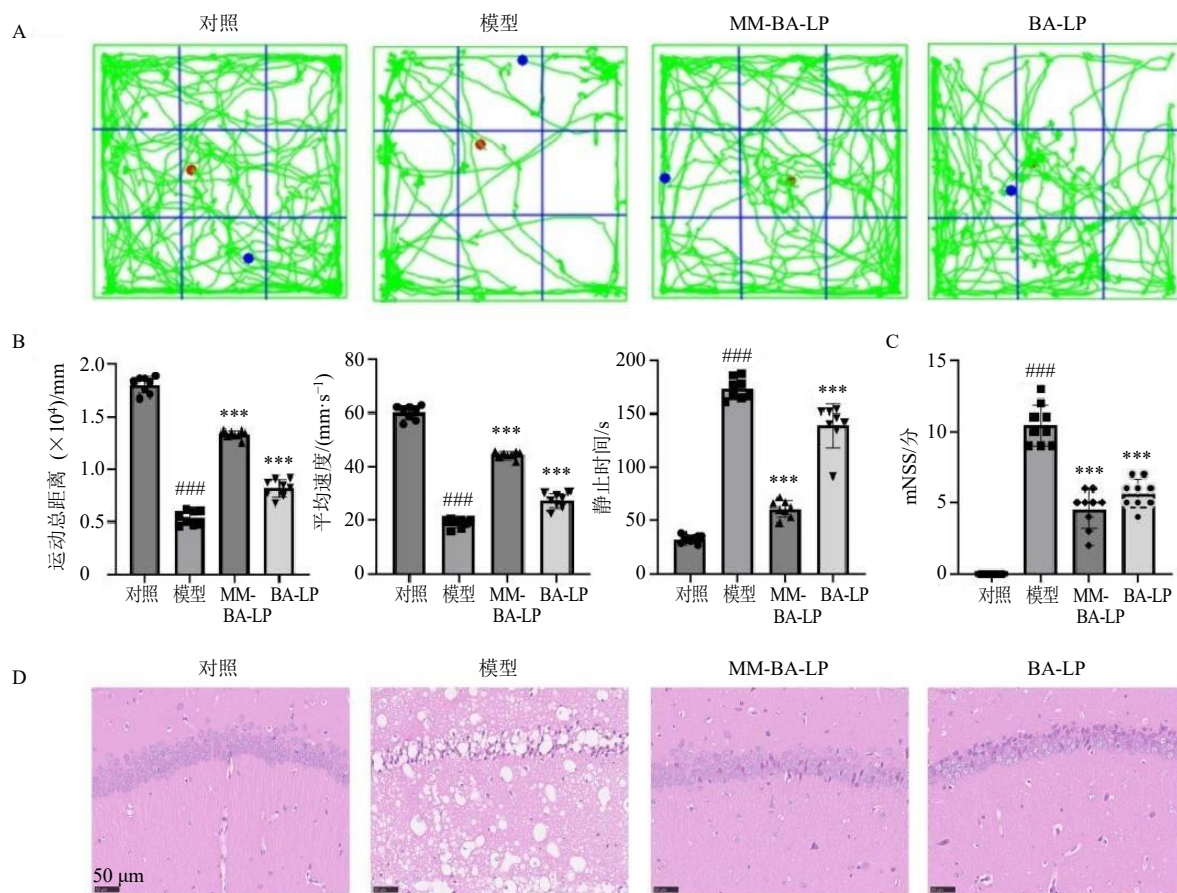
3.3 MM-BA-LP 药效学研究

缺血后恢复血流虽可挽救部分神经元, 但也会引发复杂的炎症反应, 导致继发性神经损伤^[24]。炎症与神经功能损伤密切相关, 通过研究 GCIRI 小鼠的脑组织炎症及神经功能恢复情况, 可以评价 MM-BA-LP 治疗 GCIRI 小鼠的药效。旷场实验结果 (图 3-A、B) 显示, 与对照组比较, 小鼠运动总距离、平均速度显著降低 ($P < 0.001$), 静止时间显著增加 ($P < 0.001$); 与模型组比较, BA-LP 组、MM-BA-LP 组小鼠运动总距离、平均速度显著升高 ($P < 0.001$), 静止时间显著减少 ($P < 0.001$), 且 MM-BA-LP 效果更好。mNSS 结果 (图 3-C) 显示, 与对照组比较, 模型组小鼠 mNSS 显著升高 ($P < 0.001$), 说明 GCIRI 小鼠感觉、运动、反应和平衡严重受损,

而 BA-LP 和 MM-BA-LP 能显著逆转这种损伤 ($P < 0.001$), 且 MM-BA-LP 效果更优。HE 结果 (图 3-D) 显示, 模型组小鼠脑组织发生严重的炎症细胞浸润和神经纤维溶解, BA-LP、MM-BA-LP 均能显著改善这种病变, 且 MM-BA-LP 效果更好。以上结果表明, BA-LP 能显著改善 GCIRI 小鼠的神经功能, 挽救炎症病变, 且 MM-BA-LP 的药效更好, 在 GCIRI 小鼠的治疗中更具优势。

3.4 MM-BA-LP 对 BV2 细胞活性的影响

如图 4-A 所示, 在体外细胞毒性实验中, 1~200 $\mu\text{g/mL}$ 的 BA-LP 和 MM-BA-LP 对 BV2 细胞活性无显著影响, 未见明显细胞毒性。BA-LP 和 MM-BA-LP 的质量浓度为 200 $\mu\text{g/mL}$ 时, 细胞活性显著降低 ($P < 0.01$), 且 MM-BA-LP 的细胞毒性低于



A-各组小鼠旷场实验代表轨迹图; B-旷场实验结果分析 ($n=8$); C-mNSS 结果 ($n=8$); D-HE 代表性图像 ($\times 40$); 与对照组比较: $\#P<0.01$ $\###P<0.001$; 与模型组比较: $*P<0.05$ $**P<0.01$ $***P<0.001$, 下同。

A-representative trajectory plots of open field experiment of mice in each group; B-analysis of results of open field experiment ($n=8$); C-mNSS result ($n=8$); D-HE representative images ($\times 40$); $\#P<0.01$ $\###P<0.001$ vs control group; $*P<0.05$ $**P<0.01$ $***P<0.001$ vs model group, same as below figures.

图 3 MM-BA-LP 的药效学评价 ($\bar{x} \pm s$)

Fig. 3 Pharmacodynamic evaluation of MM-BA-LP ($\bar{x} \pm s$)

BA-LP, 说明 MM 包被可能降低了纳米制剂的潜在细胞毒性。

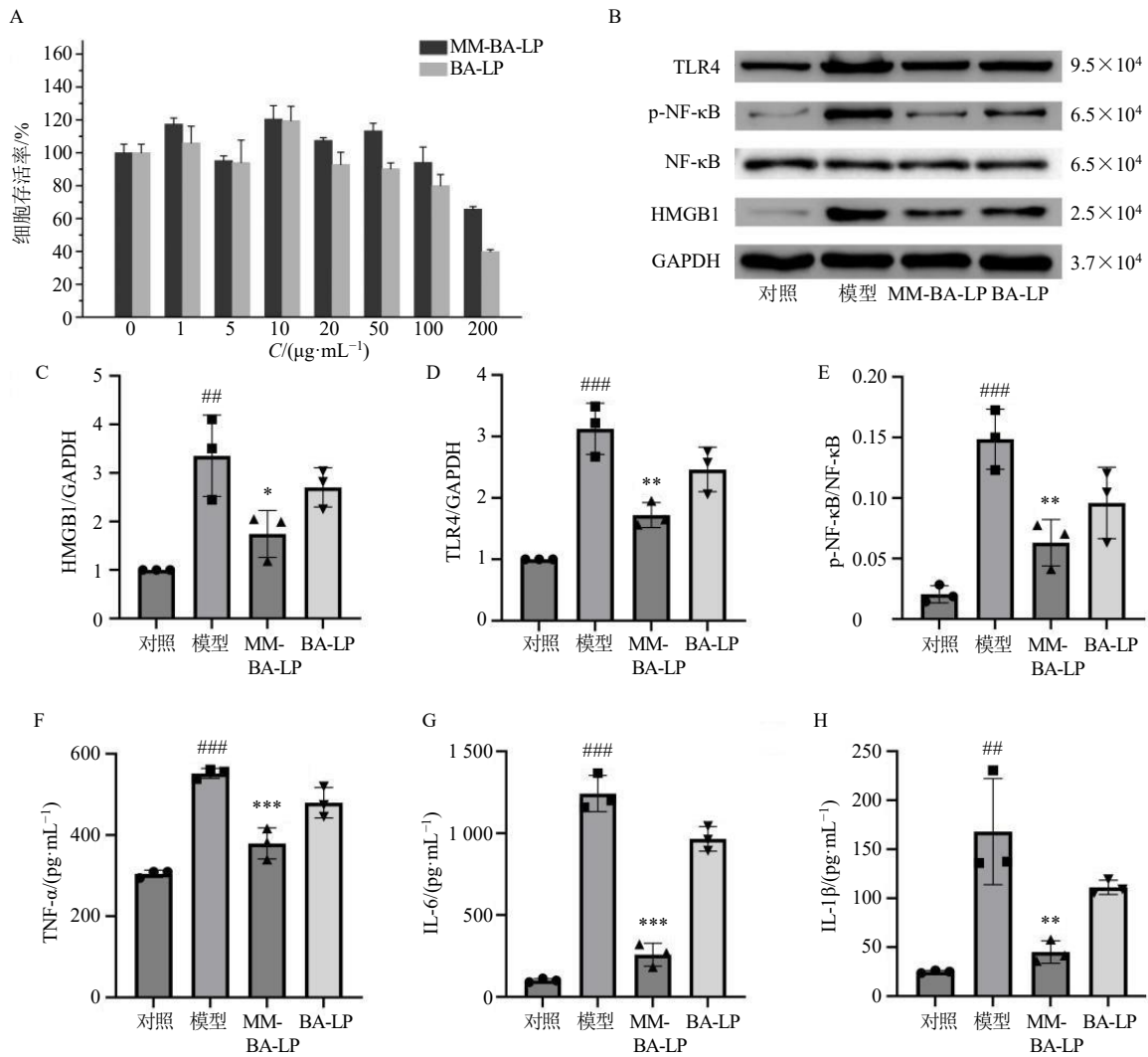
3.5 体外抗炎机制研究

药效结果显示, MM-BA-LP 具有良好的抗炎活性, 为了进一步探究其作用机制, 对 BV2 细胞建立 OGD/R 模型, 以评估 MM-BA-LP 是否能够通过 HMGB1/TLR4/NF- κ B 通路抑制炎症因子的释放。Western blotting 结果 (图 4-B~E) 显示, 与对照组比较, 模型组 HMGB1、TLR4 和 p-NF- κ B/NF- κ B 蛋白表达水平显著升高 ($P<0.01$ 、 0.001); 与模型组比较, MM-BA-LP 组 HMGB1、TLR4 和 p-NF- κ B/NF- κ B 蛋白表达水平显著降低 ($P<0.05$ 、 0.01), BA-LP 组以上蛋白表达水平呈降低趋势。ELISA 结果 (图 4-F~H) 显示, 与对照组比较, 模型组细胞上清液中炎症因子 TNF- α 、IL-6 和 IL-1 β 水平显著升

高 ($P<0.01$ 、 0.001); 与模型组比较, MM-BA-LP 组细胞上清液中 TNF- α 、IL-6 和 IL-1 β 水平均显著降低 ($P<0.01$ 、 0.001), BA-LP 组 IL-6 水平显著降低 ($P<0.01$)。表明 MM-BA-LP 在调节 GCIRI 后炎症中的作用可能是通过抑制 HMGB1/TLR4/NF- κ B 通路, 减少炎症因子 TNF- α 、IL-6 和 IL-1 β 的释放实现的。

3.6 体内抗炎机制研究

为验证 MM-BA-LP 治疗 GCIRI 小鼠的抗炎机制与体外机制研究结果的一致性, 小鼠尾 iv MM-BA-LP 和 BA-LP (50 mg/kg), 并在 GCIRI 48 h 后检测脑组织中 HMGB1、TLR4、p-NF- κ B、NF- κ B 蛋白表达及 TNF- α 、IL-6、IL-1 β 水平。结果如图 5 所示, 与对照组比较, 模型组小鼠脑组织中 HMGB1、TLR4、p-NF- κ B/NF- κ B 蛋白表达水平和 TNF- α 、IL-



A—MM-BA-LP 和 BA-LP 对 BV2 细胞活性的影响；B～E—Western blotting 测定 BV2 细胞中 HMGB1、TLR4、p-NF- κB 、NF- κB 的蛋白表达；F～H—ELISA 法检测 BV2 细胞上清液中 TNF- α 、IL-6 和 IL-1 β 水平。

A-effects of MM-BA-LP and BA-LP on viability of BV2 cells; B—E-protein expressions of HMGB1,TLR4, p-NF- κB and NF- κB in BV2 cells detected by Western blotting; F—H-levels of TNF- α , IL-6 and IL-1 β in supernatant of BV2 cells detected by ELISA.

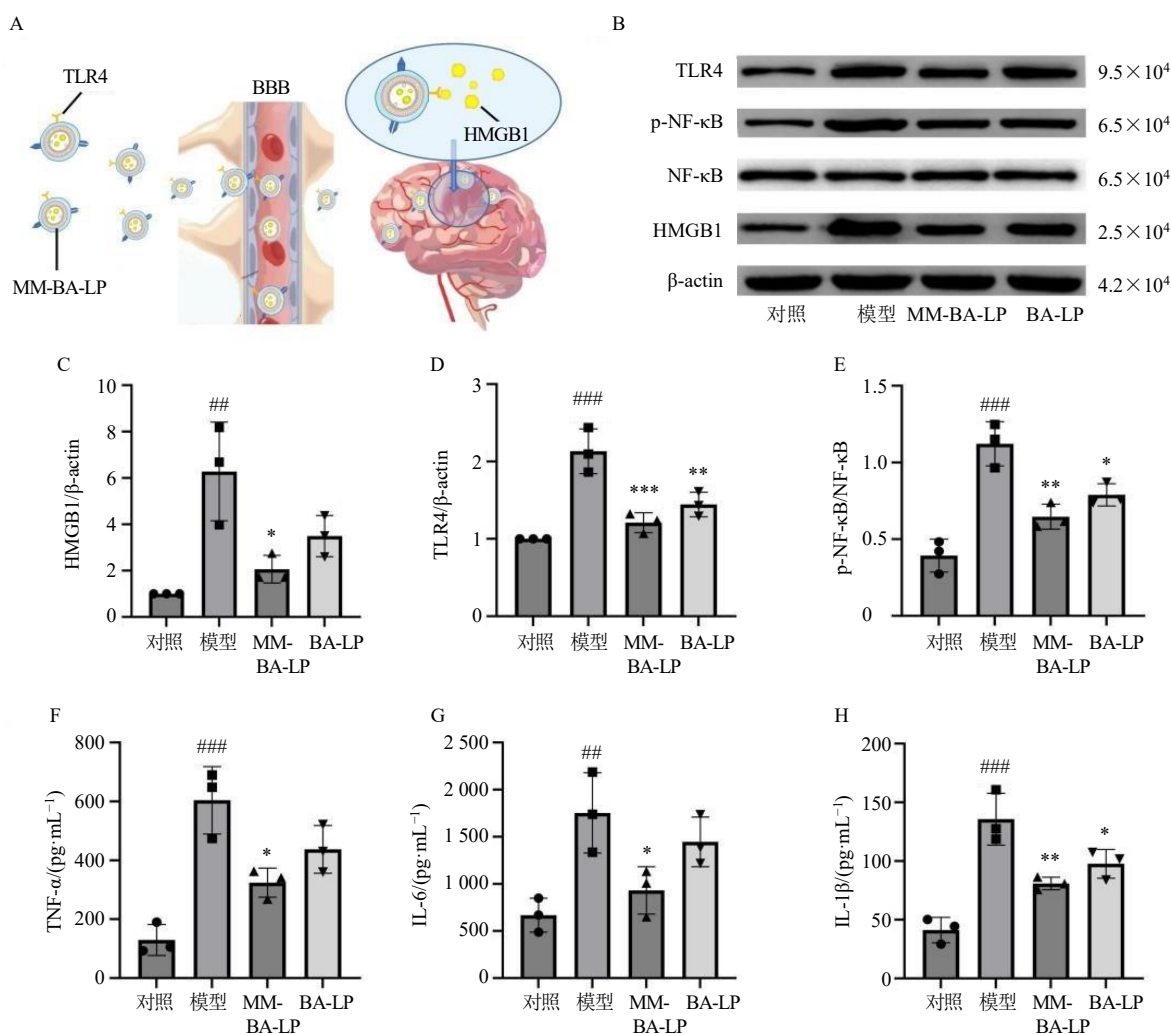
图 4 MM-BA-LP 对 OGD/R 模型的体外治疗效果 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 4 *In vitro* therapeutic effect of MM-BA-LP on OGD/R model ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

6、IL-1 β 水平均显著升高 ($P < 0.01$ 、 0.001)；与模型组比较，MM-BA-LP 组小鼠脑组织中 HMGB1、TLR4、p-NF- κB /NF- κB 蛋白表达水平和 TNF- α 、IL-6、IL-1 β 水平均显著降低 ($P < 0.05$ 、 0.01 、 0.001)，BA-LP 组脑组织中 TLR4、p-NF- κB /NF- κB 蛋白表达水平和 IL-1 β 水平显著降低 ($P < 0.05$ 、 0.01)，表明 MM-BA-LP、BA-LP 可以通过减轻炎症反应治疗 GCIRI 损伤，且 MM-BA-LP 组作用更佳，与体外实验结果一致。以上结果说明 MM-BA-LP 在 GCIRI 中的抗炎作用可能是通过抑制 HMGB1/TLR4/NF- κB 通路的激活实现的。

3.7 HE 染色和 ELISA 实验逆向验证 MM-BA-LP 抗炎机制

甘草酸是目前应用最为广泛的 HMGB1 特异性抑制剂，因此将甘草酸作为 HMGB1/TLR4/NF- κB 通路的抑制剂进行机制的体内逆向验证。如图 6-A 所示，HE 染色结果表明，甘草酸显著改善了由炎症引起的脑组织炎性细胞浸润和神经纤维溶解等炎性病变，而 MM-BA-LP 与甘草酸联合应用的效果更为显著。如图 6-B 所示，ELISA 结果表明，甘草酸单独使用以及与 MM-BA-LP 联合使用均能显著降低 TNF- α 、IL-6 和 IL-1 β 的水平 ($P < 0.001$)，且



A-治疗机制示意图; B~E-Western blotting 测定小鼠脑组织中 HMGB1、TLR4、p-NF-κB、NF-κB 的蛋白表达; F~H-ELISA 法检测小鼠脑组织中 TNF-α、IL-6 和 IL-1β 水平。

A-schematic diagram of treatment mechanism; B~E-protein expressions of HMGB1,TLR4, p-NF-κB and NF-κB in brain tissue of mice detected by Western blotting; F~H-levels of TNF-α, IL-6 and IL-1β in brain tissue of mice detected by ELISA.

图 5 MM-BA-LP 对 GCIRI 模型的体内治疗效果 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

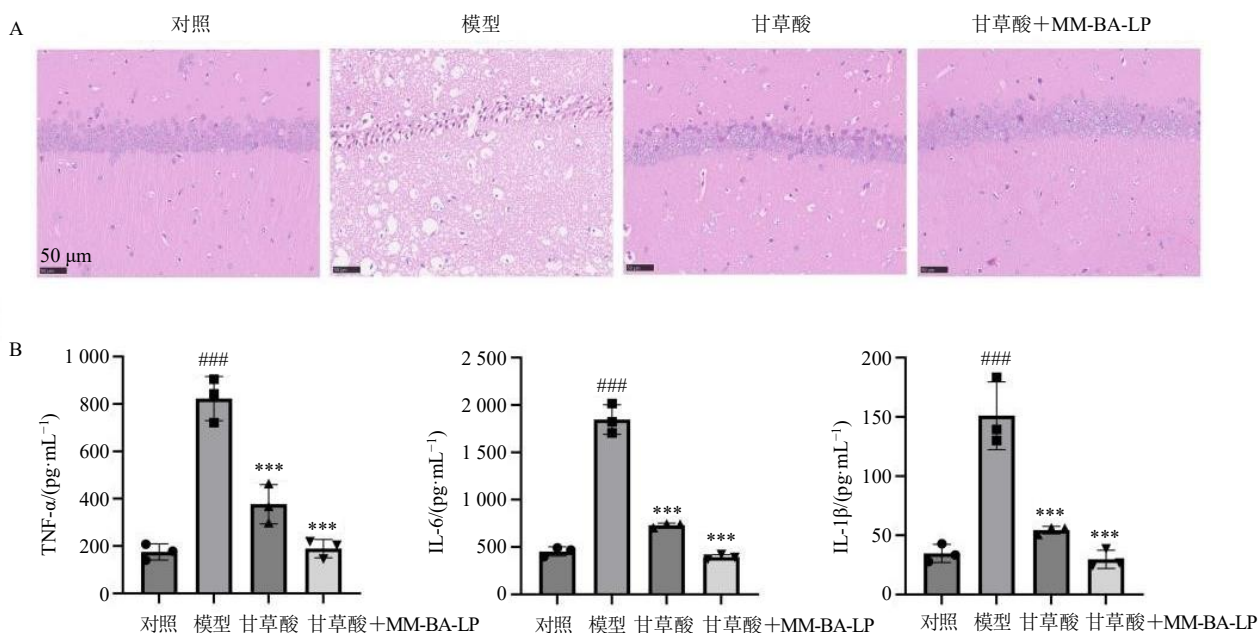
Fig. 5 *In vivo* therapeutic effect of MM-BA-LP on GCIRI model ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

联合应用的效果更佳。表明 HMGB1/TLR4/NF-κB 信号通路是 MM-BA-LP 改善小鼠 GCIRI 的关键机制。

4 讨论

本研究通过系统实验验证了 MM-BA-LP 纳米递送系统在 GCIRI 治疗中的显著优势。结果表明, MM-BA-LP 能够突破 BBB 的限制, 将治疗药物高效地递送至脑部。MM-BA-LP 充分发挥了巨噬细胞的天然生物学特性, 在体内表现出优异的稳定性和特征, 其血液循环时间较传统 BA-LP 显著延长。并且 MM-BA-LP 能够响应中枢神经系统损伤后对巨噬细胞的趋化作用, 通过主动靶向运输机制精准定位到炎症病灶区域。与常规 BA-LP 相比, MM-BA-LP 不仅显著提高了 BBB 的穿透效率, 还在脑部实现

了更显著的药物蓄积, 从而展现出更好的治疗效果。这种基于细胞膜仿生技术的纳米递送策略通过模拟天然细胞膜的结构和功能特性, 为中枢神经系统疾病的靶向治疗开辟了全新的研究路径。该技术利用生物相容性材料构建纳米载体, 不仅能够有效突破 BBB 的阻碍, 还能实现药物在中枢神经系统内的精准递送和可控释放。这种创新性的治疗策略为解决传统给药方式难以跨越生理屏障、靶向性差等关键问题提供了突破性的解决方案, 为阿尔茨海默病、帕金森病等难治性神经系统疾病的治疗带来了新的希望。此外, 相较于前期研究^[12], 本研究还对 MM-BA-LP 的血清稳定性及免疫逃逸功能进行了考察, 并结合体外和体内实验明确了 MM-BA-LP



A-HE 代表性图像 (×40); B-ELISA 法检测脑组织中 TNF-α、IL-6 和 IL-1β 水平。

A-representative images of HE (×40); B-levels of TNF-α, IL-6 and IL-1β in brain tissue detected by ELISA.

图 6 机制体内逆向验证 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 6 *In vivo* reverse validation of mechanism ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

可以显著减轻 GCIRI 后脑组织炎症, 对 GCIRI 具有良好药效, 其机制可能是通过抑制 HMGB1/TLR4/NF-κB 通路及其介导的炎症级联反应, 从而阻断细胞因子产生实现的。结合文献推测, 巨噬细胞膜包被可能作为 HMGB1 和细胞因子产生阻断器, 它能控制受体信号诱导的细胞和生物炎症反应, 通过中和细胞外 HMGB1, 减少其与 TLR4 受体的结合, 使得炎症因子合成减少^[25-26]。

本研究将具有生物活性的 MM 整合到合成纳米颗粒中, 为开发高效治疗系统开辟了新的技术路径。研究结果不仅证实了这种生物-纳米杂化系统在提升药物递送效率和靶向治疗方面的显著优势, 还为未来开发新一代智能纳米药物提供了重要的理论依据和技术支撑。本研究的技术和方法具有广泛的适用性, 可进一步拓展应用于组织工程、再生医学、免疫治疗等多个生物医学前沿领域, 为解决当前临床治疗面临的诸多挑战提供了全新的解决思路。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Katan M, Luft A. Global burden of stroke [J]. *Semin Neurol*, 2018, 38(2): 208-211.
- [2] 李海华. 短暂性脑缺血发作的研究进展 [J]. *中外医学研究*, 2018, 16(5): 179-181.
- [3] 李嵩, 刘鹏, 骆银, 等. 限制性再灌注对脑缺血再灌注损伤的保护作用 [J]. *中国微侵袭神经外科杂志*, 2020, 25(4): 177-180.
- [4] Nagy Z, Nardai S. Cerebral ischemia/reperfusion injury: From bench space to bedside [J]. *Brain Res Bull*, 2017, 134: 30-37.
- [5] 阮双, 屈强. 药物干预血脑屏障治疗脑缺血再灌注损伤的研究进展 [J]. *海南医学*, 2012, 23(23): 126-129.
- [6] Wang H J, Liu Y, He R Q, *et al.* Cell membrane biomimetic nanoparticles for inflammation and cancer targeting in drug delivery [J]. *Biomater Sci*, 2020, 8(2): 552-568.
- [7] 黄雪超, 沈诗洋, 莫然. 巨噬细胞膜仿生纳米递药系统用于炎症性疾病治疗的研究进展 [J]. *中国药物评价*, 2021, 38(4): 279-283.
- [8] Srivastava A, Srivastava P, Verma R. Role of bone marrow-derived macrophages (BMDMs) in neurovascular interactions during stroke [J]. *Neurochem Int*, 2019, 129: 104480.
- [9] Obermeier B, Verma A, Ransohoff R M. The blood-brain barrier [J]. *Handb Clin Neurol*, 2016, 133: 39-59.
- [10] Corraliza I. Recruiting specialized macrophages across the borders to restore brain functions [J]. *Front Cell Neurosci*, 2014, 8: 262.
- [11] 李克亚, 肖金银, 罗雯鹏, 等. 黄芩苷调控 TUG1/PTBP1/NLRP3 分子网络抑制巨噬细胞焦亡治疗溃疡

- 性结肠炎的机制 [J]. 中草药, 2025, 56(5): 1667-1681.
- [12] Long Y, Xiang Y, Liu S Y, *et al.* Macrophage membrane modified baicalin liposomes improve brain targeting for alleviating cerebral ischemia reperfusion injury [J]. *Nanomedicine*, 2022, 43: 102547.
- [13] Li G G, Xu R X, Cao Y H, *et al.* Interleukin-21 polymorphism affects gene expression and is associated with risk of ischemic stroke [J]. *Inflammation*, 2014, 37(6): 2030-2039.
- [14] Andersson U, Tracey K J. HMGB1 is a therapeutic target for sterile inflammation and infection [J]. *Annu Rev Immunol*, 2011, 29: 139-162.
- [15] Zhang W, Song J K, Li W, *et al.* Salvianolic acid D alleviates cerebral ischemia-reperfusion injury by suppressing the cytoplasmic translocation and release of HMGB1-triggered NF- κ B activation to inhibit inflammatory response [J]. *Mediators Inflamm*, 2020, 2020: 9049614.
- [16] Zhang J, Xia J M, Zhang Y, *et al.* HMGB1-TLR4 signaling participates in renal ischemia reperfusion injury and could be attenuated by dexamethasone-mediated inhibition of the ERK/NF- κ B pathway [J]. *Am J Transl Res*, 2016, 8(10): 4054-4067.
- [17] Salo H, Qu H S, Mitsiou D, *et al.* Disulfide and fully reduced HMGB1 induce different macrophage polarization and migration patterns [J]. *Biomolecules*, 2021, 11(6): 800.
- [18] Wang J, Li R T, Peng Z Y, *et al.* HMGB1 participates in LPS-induced acute lung injury by activating the AIM2 inflammasome in macrophages and inducing polarization of M1 macrophages via TLR2, TLR4, and RAGE/NF- κ B signaling pathways [J]. *Int J Mol Med*, 2020, 45(1): 61-80.
- [19] 徐甜, 樊姝宁, 邓楠, 等. 黄芩苷治疗大鼠缺血再灌注损伤的研究现状及展望 [J]. 中国中医基础医学杂志, 2020, 26(7): 1030-1033.
- [20] 孙玥光, 范洋溢, 高旭光. 基于 IL-33/ST2L 通路研究黄芩苷对缺血性脑卒中大鼠的神经保护作用 [J]. 中国免疫学杂志, 2023, 39(6): 1258-1263.
- [21] 令狐艳, 余资江, 肖朝伦, 等. 双侧颈总动脉夹闭法构建脑缺血再灌注损伤模型的经验总结 [J]. 四川解剖学杂志, 2010, 18(4): 19-20.
- [22] Wytrwal M, Bednar J, Nowakowska M, *et al.* Interactions of serum with polyelectrolyte-stabilized liposomes: Cryo-TEM studies [J]. *Colloids Surf B Biointerfaces*, 2014, 120: 152-159.
- [23] Doodnauth S A, Grinstein S, Maxson M E. Constitutive and stimulated macropinocytosis in macrophages: Roles in immunity and in the pathogenesis of atherosclerosis [J]. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 2019, 374(1765): 20180147.
- [24] 刘麟文, 姚俊岩. 神经系统缺血再灌注损伤保护措施的研究进展 [J]. 医学综述, 2020, 26(4): 723-728.
- [25] Chen R C, Kang R, Tang D L. The mechanism of HMGB1 secretion and release [J]. *Exp Mol Med*, 2022, 54(2): 91-102.
- [26] Ugrinova I, Pasheva E. HMGB1 protein: A therapeutic target inside and outside the cell [J]. *Adv Protein Chem Struct Biol*, 2017, 107: 37-76.

[责任编辑 李亚楠]