

## · 实验研究 ·

# 外泌体共载牛血清白蛋白联合异槲皮苷纳米体系对高糖诱导人 RPE 细胞的保护作用及机制

王梦华 胡芷柔

郑州大学第一附属医院眼科, 郑州 450052

通信作者: 王梦华, Email: wangmenghua0615@163.com

**【摘要】 目的** 构建外泌体(EXO)共载牛血清白蛋白联合异槲皮苷(BSA@ISO)纳米体系,并研究该纳米体系对高糖诱导人视网膜色素上皮细胞(ARPE-19)损伤模型的保护机制。**方法** 采用超速离心法提取 ARPE-19 细胞 EXO,透射电子显微镜(TEM)观察结构并采用 Western blot 检测 EXO 标志物表达。通过振荡合成法制备 BSA@ISO 纳米颗粒。采用膜挤出仪器制备 ROS 响应性 EXO 共载 BSA@ISO 纳米体系(BSA@ISO@EXO)。测定 BSA@ISO@EXO 粒径和 Zeta 电位并采用 TEM 观察形态;采用分光光度计和红外光谱分析化学结构;采用差量法计算包封率和负载率。将细胞分为对照组、模型组、低剂量 ISO 纳米体系组(载药 ISO 为 5  $\mu\text{mol/L}$ )、中剂量 ISO 纳米体系组(载药 ISO 为 10  $\mu\text{mol/L}$ )、高剂量 ISO 纳米体系组(载药 ISO 为 20  $\mu\text{mol/L}$ )、单纯 ISO 组。采用 CCK-8 法测定各组不同时间点细胞活性;采用流式细胞仪测定各组培养 48 h 细胞凋亡率;采用 ELISA 法测定各组培养上清液中炎症因子肿瘤坏死因子- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )、白细胞介素-1 $\beta$ (IL-1 $\beta$ )水平,采用生化试剂盒测定细胞抗氧化酶谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-PX)和超氧化物歧化酶(SOD)活性及上清液中氧化应激标志物丙二醛(MDA)水平。**结果** BSA@ISO@EXO 纳米体系呈均匀球形,平均粒径约 39.6 nm;紫外可见光谱和红外光谱显示该纳米体系存在 BSA、ISO 和 EXO 的特征吸收峰;该纳米体系的包封率为(76.6 $\pm$ 5.0)% ,负载率为(10.3 $\pm$ 0.6)% ,24 h 药物释放率达 75.1%。CCK-8 实验显示,各不同 ISO 浓度纳米体系组培养 48 h 细胞活力均优于单纯 ISO 组,差异均有统计学意义(均  $P<0.05$ )。中剂量 ISO 纳米体系组细胞 ROS 水平明显低于单纯 ISO 组,差异有统计学意义( $P<0.01$ )。中剂量 ISO 纳米体系组细胞上清中 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  和 MDA 水平明显低于模型组和高剂量 ISO 纳米体系组,GSH-PX 和 SOD 活性明显高于模型组和高剂量 ISO 纳米体系组,差异均有统计学意义(均  $P<0.05$ )。**结论** 成功构建稳定的 BSA@ISO@EXO 纳米体系。该体系通过提高 ISO 生物利用度增强抗氧化和抗炎作用,为糖尿病视网膜病变治疗提供新策略。

**【关键词】** 糖尿病视网膜病变; ROS 响应性外泌体; BSA@ISO 纳米体系; 抗氧化; 抗炎

DOI: 10.3760/cma.j.cn115989-20250515-00157

## Protective effects and mechanisms of exosomes co-loaded with BSA@ISO nanoparticles on high glucose-induced human retinal pigment epithelial cells

Wang Menghua, Hu Zhirou

Department of Ophthalmology, The First Affiliated Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou 450052, China

Corresponding author: Wang Menghua, Email: wangmenghua0615@163.com

**【Abstract】 Objective** To construct an exosome (EXO)-based nanosystem co-loaded with bovine serum albumin and isoquercitrin (BSA@ISO), and to investigate its protective mechanism against high glucose-induced damage in human retinal pigment epithelial cells (ARPE-19). **Methods** EXO was extracted from ARPE-19 cells via ultracentrifugation, and the structure was observed using transmission electron microscopy (TEM). EXO markers were detected by Western blot. BSA@ISO nanoparticles were prepared using the oscillating synthesis method. A ROS-responsive EXO-based nanosystem co-loaded with BSA@ISO (BSA@ISO@EXO) was constructed using a membrane extruder. The particle size and zeta potential of BSA@ISO@EXO were measured and its morphology was observed by TEM. Chemical structure was analyzed using a spectrophotometer and infrared spectroscopy. Encapsulation efficiency and drug loading capacity were calculated using the differential method. Cells were divided into control group, model group, low-dose ISO nanosystem group (5  $\mu\text{mol/L}$  ISO), medium-dose ISO nanosystem group (10  $\mu\text{mol/L}$  ISO), high-dose ISO nanosystem group (20  $\mu\text{mol/L}$  ISO), and pure ISO group. Cell viability at different time points was

assessed using the CCK-8 assay. Apoptosis rate after 48 hours of culture was measured by flow cytometry. Levels of inflammatory factors tumor necrosis factor (TNF)- $\alpha$  and interleukin (IL)-1 $\beta$  in the cell supernatant were determined by ELISA, while activities of antioxidant enzymes glutathione peroxidase (GSH-PX) and superoxide dismutase (SOD) and the level of oxidative stress marker malondialdehyde (MDA) in the supernatant were measured using biochemical kits. **Results** The BSA@ISO@EXO nanosystem exhibited a uniform spherical shape with an average particle size of approximately 39.6 nm. UV-visible and IR spectra showed characteristic absorption peaks of BSA, ISO and EXO. The encapsulation efficiency of the nanosystem was (76.6 $\pm$ 5.0)%, the drug loading capacity was (10.3 $\pm$ 0.6)%, and the 24-hour drug release rate reached 75.1%. CCK-8 assay showed that cell viability in all ISO nanosystem groups after 48-hour culture was significantly higher than that in the pure ISO group (all  $P < 0.05$ ). The ROS level was significantly lower in the medium-dose ISO group than in the pure ISO group ( $P < 0.01$ ). The levels of TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , and MDA were significantly lower and GSH-PX and SOD activities were significantly higher in the medium-dose ISO nanosystem group than those in the model and high-dose ISO nanosystem groups (all  $P < 0.05$ ). **Conclusions** A stable BSA@ISO@EXO nanosystem was successfully constructed. This system enhances the antioxidant and anti-inflammatory effects by improving the bioavailability of ISO, offering a new strategy for the treatment of diabetic retinopathy.

[Key words] Diabetic retinopathy; ROS-responsive exosomes; BSA@ISO nanosystem; Antioxidant; Anti-inflammatory

DOI:10.3760/cma.j.cn115989-20250515-00157

糖尿病视网膜病变(diabetic retinopathy, DR)是糖尿病引发的严重微血管并发症,也是全球成年人视力丧失的主要原因之一<sup>[1-2]</sup>。在DR的病理研究中,高糖环境被认为是触发视网膜损伤的关键因素<sup>[3]</sup>。高糖环境通过多种代谢途径诱导视网膜细胞的氧化应激反应,进而引发炎症级联反应,成为DR早期病变的核心机制。视网膜色素上皮(retinal pigment epithelial, RPE)细胞在DR早期病理过程中扮演重要角色,其不仅维持视网膜屏障功能,还通过分泌血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)等调节血管内皮细胞的增殖和通透性<sup>[4]</sup>。高糖诱导的RPE细胞氧化应激和炎症反应可通过旁分泌机制加剧血管内皮细胞损伤,促进微血管渗漏和新生血管形成<sup>[4-5]</sup>。因此,以RPE细胞为研究对象为揭示DR早期病理机制及药物干预效果提供重要视角。异槲皮苷(isoquercitrin, ISO)因其强效抗氧化与抗炎作用,减轻氧化应激与血管损伤,在DR治疗中展现出潜力。然而,水溶性差、生物利用度低及靶向性不足严重限制了其临床应用。因此,开发基于纳米材料的递送系统对于提高其稳定性、眼部生物利用度及治疗效果至关重要<sup>[6]</sup>。

研究显示,传统抗氧化剂生物利用度低、靶向性差,难以在病变局部达到有效浓度,限制了临床应用<sup>[7]</sup>;且传统DR治疗方法如激光光凝和抗VEGF药物疗效有限,且需频繁给药,存在发生不良反应的风险<sup>[8]</sup>。因此探索一种新型的药物递送系统至关重要。近年来,响应性纳米递送系统在眼科疾病治疗中展现

出独特优势。基于外泌体(exosome, EXO)的智能载体可通过模拟细胞天然分泌囊泡的特性,突破血-视网膜屏障,并实现病变部位的精准药物释放<sup>[9]</sup>。此外,活性氧(reactive oxygen species, ROS)响应性材料可在高氧化应激微环境中特异性释放药物,提高治疗效率并降低全身毒性,为DR治疗提供了新思路<sup>[10-11]</sup>。ISO可通过抑制氧化应激和炎症通路减轻DR的病理损伤,因此本研究选择其作为模型药物。近年来,外泌体膜脂质成分对高ROS微环境敏感,可实现被动靶向与响应性释药。纳米技术和EXO作为药物载体展现出提高药物生物利用度及靶向递送的潜力,可增强抗氧化和抗炎效果<sup>[12]</sup>。本研究构建外泌体共载牛血清白蛋白(bovine serum albumin, BSA)联合ISO纳米体系(BSA@ISO@EXO),利用人RPE细胞模型,系统探究其通过提高ISO生物利用度发挥抗氧化和抗炎作用的机制,旨在为DR精准治疗提供新策略。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

1.1.1 细胞来源 ARPE-19细胞株购于上海中科院细胞库。

1.1.2 主要试剂及仪器 BCA蛋白定量试剂盒(美国Thermo Fisher公司);ISO(美国Med Chem Express公司);Annexin V-FITC/PI双染试剂盒(上海碧云天生物技术有限公司);白细胞介素(interleukin, IL)-1 $\beta$ 检测试剂盒、肿瘤坏死因子(tumor necrosis factor, TNF)- $\alpha$ 检测试剂盒(美国R&D Systems公司);苏木

精-伊红 (hematoxylin and eosin, HE) 染色试剂盒 (武汉赛维尔生物科技有限公司); 鼠抗 VEGF 抗体 (66828-1-1g, 美国 Proteintech 公司); 兔抗 Calnexin 抗体 (ab92573)、兔抗 CD63 抗体 (ab134045)、兔抗 TSG101 抗体 (ab125011)、兔抗 CD9 抗体 (ab236630) (英国 Abcam 公司); 谷胱甘肽过氧化物酶 (glutathione peroxidase, GSH-PX)、丙二醛 (malondialdehyde, MDA)、超氧化物歧化酶 (superoxide dismutase, SOD) 试剂盒 (南京建成科技有限公司)。高速离心机 (5810R, 德国 Eppendorf 公司); 透射电子显微镜 (transmission electron microscope, TEM) (Talos L120C)、酶标仪 (Varioskan LUX) (美国 Thermo Fisher Scientific 公司); 凝胶电泳系统 (Mini-PROTEAN Tetra, 美国 Bio-Rad 公司); 脂质体挤出仪 (美国 Avanti Polar Lipids 公司); ZETA 电位分析仪 (Zetasizer Nano ZS90, 英国马尔文帕纳科公司); 分光光度计 (UV-2600i, 日本 Shimadzu 公司); 光学显微镜 (BX53, 日本 Olympus 公司); 流式细胞仪 (FACSVerse, 美国 Dickinson Biosciences 公司)。

## 1.2 方法

**1.2.1 EXO 制备及鉴定** 提取 ARPE-19 细胞株外泌体, 收集 ARPE-19 细胞上清液, 依次经  $300\times g$ 、 $2\,000\times g$ 、 $10\,000\times g$  离心去除细胞及碎片;  $110\,000\times g$  超速离心 70 min, 沉淀重悬于 PBS 即得外泌体。采用 TEM 观察 EXO 形态。采用 Western blot 检测 EXO 标志物 Calnexin、CD63、TSG101 和 CD9 表达, 确认 EXO 纯度。采用 BCA 蛋白定量试剂盒测定 EXO 蛋白含量。

**1.2.2 BSA@ISO@EXO 合成与表征方法** 通过振荡合成法制备 BSA@ISO 纳米颗粒, 取 40 mg/ml BSA 与  $25\ \mu\text{mol/L}$  ISO 按 1:1 膜挤压器共挤压混合; 在 2-(N-吗啉代)乙磺酸缓冲液中  $37\ ^\circ\text{C}$  振荡 4 h, 超滤纯化后获得 BSA@ISO, 并于  $4\ ^\circ\text{C}$  保存备用。BSA@ISO 与 EXO (按照体积 5:1) 混合 (通过调节 BSA@ISO 母液浓度控制终剂量, 从而配制低、中、高载药浓度纳米体系), 经脂质体挤出仪挤压 20 次制备 BSA@ISO@EXO (透析法去除游离药物)。采用 ZETA 电位分析仪测定各组纳米颗粒粒径和 Zeta 电位; 采用 TEM 观察形态; 采用分光光度计和红外光谱分析化学结构。采用差量法计算包封率和负载率: 包封率 = 包封的药物质量/药物投加量  $\times 100\%$ , 负载率 = 包封的药物质量/(包封的药物质量 + 载体质量)  $\times 100\%$ 。采用透析法测定 24 h 药物释放曲线。

**1.2.3 细胞培养与高糖模型建立** 采用含体积分数 10% 胎牛血清、100 U/ml 青霉素-链霉素的 DMEM 培

养基, 于  $37\ ^\circ\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  培养箱中培养细胞。待细胞融合度达 90% 时, 用 0.25% 胰蛋白酶消化 1 min,  $150\times g$  离心 3 min 后重悬传代。选用第 3~6 代生长状态良好的细胞。将细胞分为对照组、模型组、低剂量 ISO 纳米体系组 (载药 ISO 为  $5\ \mu\text{mol/L}$ )、中剂量 ISO 纳米体系组 (载药 ISO 为  $10\ \mu\text{mol/L}$ )、高剂量 ISO 纳米体系组 (载药 ISO 为  $20\ \mu\text{mol/L}$ )、单纯 ISO 组 (ISO 为  $10\ \mu\text{mol/L}$ )。为克服 ISO 水溶性差的问题, 单纯 ISO 组使用 DMSO 助溶 (终浓度  $< 0.1\%$ ), 制备  $10\ \mu\text{mol/L}$  ISO 储备液; 而 BSA@ISO@EXO 纳米体系通过 BSA 的疏水腔包载与 EXO 膜融合, 显著提高 ISO 的溶解性与稳定性。其中对照组细胞常规培养, 其余各组细胞均于含 30 mmol/L 葡萄糖和相应浓度 ISO 的培养基中培养。

**1.2.4 CCK-8 法测定细胞活性** 将对数生长期细胞以  $5\times 10^3$ /孔接种于 96 孔板, 按照 1.2.3 方法进行细胞分组处理, 于培养 0、24、48、72 h 每孔加入  $10\ \mu\text{l}$  CCK-8 溶液,  $37\ ^\circ\text{C}$  避光孵育 2 h。用酶标仪测定 450 nm 处吸光度 (absorbance, A) 值, 计算各组细胞活性, 细胞活性 = 各组 A 值/对照组 A 值  $\times 100\%$ 。

**1.2.5 DCFH-DA 测定细胞内 ROS 水平** 将细胞接种至 24 孔板, 参照 1.2.3 方法进行细胞分组处理, 培养 48 h 后胰蛋白酶消化收集细胞, 低速离心收集细胞, 加入 1 ml PBS 重悬, 轻柔吹打混匀; 加入  $1\ \mu\text{l}$  DCFH-DA 染液,  $37\ ^\circ\text{C}$  避光孵育 30 min; 低速离心弃上清后, 用 PBS 洗涤 2~3 次; 最后用  $100\ \mu\text{l}$  PBS 重悬细胞, 过 200 目筛网后流式细胞仪上机检测, 设置 488 nm 绿色荧光通道, 采用 BD FlowJo™ 软件分析细胞内 ROS 含量变化。

**1.2.6 Annexin V/PI 双染法测定细胞凋亡率** 胰蛋白酶消化收集各组培养 48 h 后细胞, PBS 洗涤后重悬于  $1\times$  Binding Buffer, 加入  $5\ \mu\text{l}$  Annexin V-FITC 和  $5\ \mu\text{l}$  PI,  $37\ ^\circ\text{C}$  避光孵育 15 min, 流式细胞仪上机检测设置 488 nm 通道, 采用 BD FlowJo™ 软件分析各组细胞凋亡率。

**1.2.7 ELISA 法测定炎症因子 TNF- $\alpha$  及 IL-1 $\beta$  水平** 各组细胞分组培养 48 h, 收集上清液  $200\ \mu\text{l}$ ,  $1\,500\ \text{r/min}$  离心 10 min, 分离上清后  $-80\ ^\circ\text{C}$  冻存备用。按照 TNF- $\alpha$  及 IL-1 $\beta$  试剂盒说明书处理上清液, 采用酶标仪检测 450 nm 下 A 值, 计算各组上清液中 TNF- $\alpha$  及 IL-1 $\beta$  质量浓度。

**1.2.8 生化试剂盒法测定细胞内 GSH-PX 和 SOD 活性及上清液中 MDA 水平** 取 1.2.7 方法收集的培养上清液和细胞裂解液, 分别按照 GSH-PX、MDA 以及

SOD 检测试剂盒说明书进行处理。采用酶标仪检测 450 nm 处 A 值,并计算各组细胞上清液中 GSH-PX、MDA 以及 SOD 水平。

### 1.3 统计学方法

采用 SPSS 22 统计学软件进行统计分析。计量资料经 Shapiro-Wilk 检验均符合正态分布,以  $\bar{x} \pm s$  表示。各组检测指标总体差异比较采用单因素方差分析,各组不同时间点检测指标总体差异比较采用两因素方差分析,组间两两比较采用 LSD-*t* 检验。采用双尾检验,  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 外泌体鉴定

TEM 显示外泌体呈典型杯状结构,粒径分布为 30~150 nm,平均粒径约 100 nm (图 1A)。Western blot 确认外泌体高表达 CD63、TSG101 和 CD9,无内质网标志物 Calnexin 表达,证明外泌体纯度高 (图 1B)。

### 2.2 BSA@ISO@EXO 纳米材料的构建和表征

TEM 显示,合成的 BSA@ISO 为均匀的球形,表面粗糙 (图 2A);合成的 BSA@ISO@EXO 呈均匀的球形 (图 2B)。BSA、BSA@ISO 和 BSA@ISO@EXO 的平均粒径分别为  $(25.2 \pm 2.6)$ 、 $(26.4 \pm 2.7)$  和  $(39.6 \pm 5.2)$  nm (图 2C, D),平均电位分别为 -12.2、-15.3 和 -13.4 mV (图 2E);紫外可见光谱分析结果显示,BSA 在 279 nm 处呈现出显著的特征吸收峰,ISO 则分别在 351 和 260 nm 处出现特征吸收峰,BSA@ISO 和 BSA@ISO@EXO 纳米体系在 279、351 和 260 nm 处均出现了相应的特征吸收峰,证明了 BSA@ISO 的成功制备 (图 2F)。BSA 在  $1\ 654\ \text{cm}^{-1}$  和  $1\ 560\ \text{cm}^{-1}$  附近的吸收峰分别对应酰胺 I 带 (C=O 伸缩振动) 和酰胺 II 带 (N-H 弯曲振动);ISO 在  $3\ 361\ \text{cm}^{-1}$  附近的峰归属于酚

羟基 (-OH) 伸缩振动,  $1\ 605\ \text{cm}^{-1}$  和  $1\ 509\ \text{cm}^{-1}$  处的峰为苯环骨架振动。BSA@ISO@EXO 复合体系中,

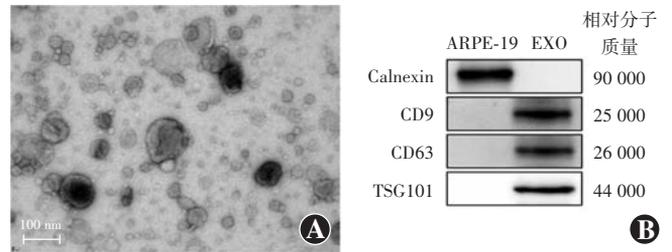


图 1 外泌体的表征 A:外泌体 TEM 图 (标尺 = 100 nm) B:外泌体各标志物表达电泳图 CD63、TSG101 和 CD9 蛋白高表达,内质网标志物 Calnexin 无明显表达 ARPE:人视网膜色素上皮细胞;EXO:外泌体

Figure 1 Characterization of exosomes A:TEM image of exosomes (scale bar = 100 nm) B: Electropherograms of exosome markers CD63, TSG101 and CD9 proteins were highly expressed, but the endoplasmic reticulum marker Calnexin was not significantly expressed ARPE:human retinal pigment epithelial cell;EXO: exosome

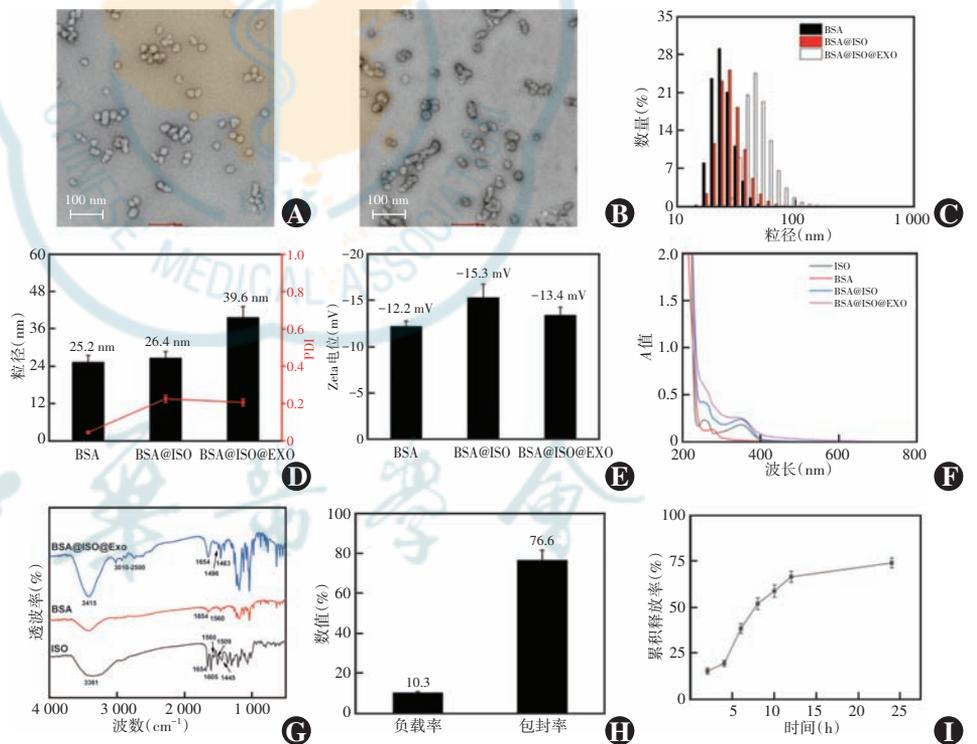


图 2 BSA@ISO@EXO 的表征 A:BSA@ISO 的 TEM 图 (标尺 = 100 nm) B:BSA@ISO@EXO 的 TEM 图 (标尺 = 100 nm) C:各材料粒径分布 D:各材料平均粒径 红线代表纳米颗粒分散性 E:各材料平均 Zeta 电位 F:各材料紫外可见光谱 G:各材料红外光谱 H:BSA@ISO@EXO 封装率和负载率 最大投料 600  $\mu\text{g}$  ISO 所对应的封装率和负载率 I:BSA@ISO@EXO 释放曲线 BSA:牛血清白蛋白;ISO:异槲皮苷;EXO:外泌体

Figure 2 Characterization of BSA@ISO@EXO A:TEM image of BSA@ISO (scale bar = 100 nm) B:TEM image of BSA@ISO@EXO (scale bar = 100 nm) C:Size distribution of various materials D:Average particle size of various materials The red curve represented the size distribution profile E:Average zeta potential of various materials F:UV-visible spectra of various materials G:FT-IR spectra of various materials H:Encapsulation efficiency and drug loading rate of BSA@ISO@EXO Corresponding to a maximum ISO feed of 600  $\mu\text{g}$  I:Release profile of BSA@ISO@EXO BSA:bovine serum albumin;ISO: isoquercitrin;EXO: exosome

3 415  $\text{cm}^{-1}$  附近的宽峰为三者-OH 的叠加峰; 1 654  $\text{cm}^{-1}$  处的峰为 BSA 酰胺 I 带与 ISO 酮羰基的复合吸收峰; 1 496  $\text{cm}^{-1}$  和 1 463  $\text{cm}^{-1}$  处的峰则主要来自 ISO 苯环的振动, 以上结果表明 BSA@ISO@EXO 成功构建(图 2G)。包封率和负载率分别为 (76.6±5.0)% 和 (10.3±0.6)% (图 2H)。BSA@ISO@EXO 在 24 h 内累积释放 75.1%, 说明具有良好的释放性能(图 2I)。

### 2.3 各组细胞活性比较

各组不同时间点细胞活力总体比较, 差异有统计学意义 ( $F_{\text{分组}} = 224.2, P < 0.001; F_{\text{时间}} = 66.0, P < 0.001$ ), 对照组细胞活性随着培养时间延长而逐渐增强, 模型组培养 48 和 72 h 时细胞活力显著低于相应时间点对照组, 差异均有统计学意义(均  $P < 0.01$ ); 各不同 ISO 浓度纳米体系组培养 48 h 细胞活力明显优于单纯 ISO 组, 差异均有统计学意义(均  $P < 0.05$ ) (图 3)。故后期药物组的处理时间均为 48 h。

### 2.4 各组细胞 ROS 水平比较

各组细胞 ROS 水平总体比较, 差异有统计学意义 ( $F = 93.3, P < 0.001$ )。与对照组比较, 除中剂量 ISO 纳米体系组外, 其他各组细胞 ROS 水平明显升高, 差异均有统计学意义(均  $P < 0.01$ ); 低剂量 ISO 纳米体系组、中剂量 ISO 纳米体系组、高剂量 ISO 纳米体系组和单纯 ISO 组 ROS 水平均较模型组明显下降, 中剂量 ISO 纳米体系组 ROS 水平明显低于低剂量 ISO 纳米体系组、高剂量 ISO 纳米体系组和单纯 ISO 组, 差异均有统计学意义(均  $P < 0.01$ ) (表 1)。

### 2.5 各组细胞凋亡率、炎症因子水平和抗氧化酶活性比较

与对照组比较, 其他各组细胞凋亡率明显升高, 差异均有统计学意义(均  $P < 0.05$ ); 中剂量 ISO 纳米体系组凋亡率明显低于模型组、低剂量 ISO 纳米体系组和单纯 ISO 组, 差异均有统计学意义(均  $P < 0.05$ ) (表 2)。

与对照组比较, 其他各组细胞上清中 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  和 MDA 水平明显上升, GSH-PX 和 SOD 活性明显下降, 差异均有统计学意义(均  $P < 0.01$ ); 与模型组比较, 中剂量 ISO 纳米体系组、高剂量 ISO 纳米体系组细胞上清中 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  和 MDA 水平均下降, GSH-PX 和 SOD 活性明显升

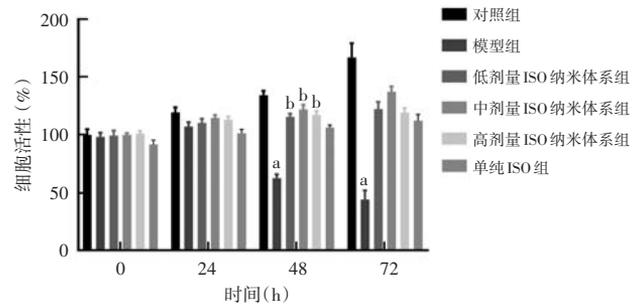


图 3 各组不同时间点细胞活性比较  $F_{\text{分组}} = 224.2, P < 0.001; F_{\text{时间}} = 66.0, P < 0.001$ . 与同时间点对照组比较,  $^a P < 0.05$ ; 与同时间点单纯 ISO 组比较,  $^b P < 0.05$  (两因素方差分析, LSD- $t$  检验;  $n = 4$ ) ISO: 异槲皮苷

Figure 3 Comparison of cell viability among different groups at different time points  $F_{\text{group}} = 224.2, P < 0.001; F_{\text{time}} = 66.0, P < 0.001$ . Compared with the control group at the same time points,  $^a P < 0.05$ ; compared with the ISO group at the same time points,  $^b P < 0.05$  (Two-way ANOVA, LSD- $t$  test;  $n = 4$ ) ISO: isoquercitrin

表 1 各组细胞 ROS 平均荧光强度比较 ( $\bar{x} \pm s$ )  
Table 1 Comparison of mean fluorescence intensity of ROS among different groups ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	样本量	ROS 平均荧光强度
对照组	3	92.5±5.1
模型组	3	951.7±60.9 <sup>a</sup>
单纯 ISO 组	3	616.0±13.8 <sup>ab</sup>
低剂量 ISO 纳米体系组	3	509.0±47.6 <sup>abc</sup>
中剂量 ISO 纳米体系组	3	131.7±10.3 <sup>b</sup>
高剂量 ISO 纳米体系组	3	277.0±12.4 <sup>abc</sup>
F 值		93.3
P 值		<0.001

注: 与对照组比较,  $^a P < 0.05$ ; 与模型组比较,  $^b P < 0.05$ ; 与中剂量 ISO 纳米体系组比较,  $^c P < 0.05$  (单因素方差分析, LSD- $t$  检验) ROS: 活性氧簇; ISO: 异槲皮苷

Note: Compared with the control group,  $^a P < 0.05$ ; compared with the model group,  $^b P < 0.05$ ; compared with the ISO group,  $^c P < 0.05$ ; compared with the medium BSA@ISO@EXO group,  $^c P < 0.05$  (One-way ANOVA, LSD- $t$  test) ROS: reactive oxygen species; ISO: isoquercitrin

表 2 各组细胞凋亡率、上清液中炎症因子水平及 MDA 水平比较 ( $\bar{x} \pm s$ )  
Table 2 Comparison of apoptosis rate, inflammatory factor levels, and MDA level in cell supernatant among different groups ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	样本量	细胞凋亡率 (%)	IL-1 $\beta$ (pg/ml)	TNF- $\alpha$ (pg/ml)	MDA (nmol/ml)
对照组	4	6.3±0.4	38.3±10.9	28.8±3.5	145.0±16.7
模型组	4	27.1±1.6 <sup>a</sup>	182.9±5.4 <sup>a</sup>	165.8±9.5 <sup>a</sup>	539.5±20.2 <sup>a</sup>
单纯 ISO 组	4	21.8±2.6 <sup>abc</sup>	151.5±8.4 <sup>ab</sup>	121.0±14.7 <sup>ab</sup>	389.0±26.5 <sup>ab</sup>
低剂量 ISO 纳米体系组	4	24.0±1.7 <sup>ac</sup>	157.2±2.8 <sup>a</sup>	132.3±4.1 <sup>a</sup>	400.0±24.4 <sup>a</sup>
中剂量 ISO 纳米体系组	4	15.8±1.2 <sup>ab</sup>	110.5±7.1 <sup>ab</sup>	62.6±4.5 <sup>ab</sup>	212.5±16.5 <sup>ab</sup>
高剂量 ISO 纳米体系组	4	12.8±2.3 <sup>ab</sup>	135.1±5.3 <sup>abc</sup>	107.6±5.0 <sup>abc</sup>	315.5±14.7 <sup>abc</sup>
F 值		89.72	47.26	64.33	64.51
P 值		<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

注: 与对照组比较,  $^a P < 0.05$ ; 与模型组比较,  $^b P < 0.05$ ; 与中剂量 ISO 纳米体系组比较,  $^c P < 0.05$  (单因素方差分析, LSD- $t$  检验) MDA: 丙二醛; ISO: 异槲皮苷; IL: 白细胞介素; TNF: 肿瘤坏死因子

Note: Compared with the control group,  $^a P < 0.05$ ; compared with the model group,  $^b P < 0.05$ ; compared with the medium BSA@ISO@EXO group,  $^c P < 0.05$  (One-way ANOVA, LSD- $t$  test) MDA: malondialdehyde; ISO: isoquercitrin; IL: interleukin; TNF: tumor necrosis factor

高,差异均有统计学意义(均 $P<0.01$ );中剂量 ISO 纳米体系组的 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  和 MDA 水平明显低于高剂量 ISO 纳米体系组,GSH-PX 和 SOD 活性明显高于高剂量 ISO 纳米体系组,差异均有统计学意义(均 $P<0.01$ )(表 2、3)。

表 3 各组细胞中抗氧化酶活性比较( $\bar{x}\pm s$ )  
Table 3 Comparison of antioxidant enzyme levels in cell among different groups ( $\bar{x}\pm s$ )

组别	样本量	GSH-PX (U/ml)	SOD (U/ml)
对照组	4	380.8 $\pm$ 23.2	27.6 $\pm$ 2.1
模型组	4	74.0 $\pm$ 12.9 <sup>a</sup>	3.0 $\pm$ 0.3 <sup>a</sup>
单纯 ISO 组	4	111.8 $\pm$ 22.1 <sup>a</sup>	10.0 $\pm$ 0.5 <sup>ab</sup>
低剂量 ISO 纳米体系组	4	114.4 $\pm$ 13.7 <sup>a</sup>	10.2 $\pm$ 0.6 <sup>a</sup>
中剂量 ISO 纳米体系组	4	221.6 $\pm$ 11.9 <sup>ab</sup>	19.6 $\pm$ 2.2 <sup>ab</sup>
高剂量 ISO 纳米体系组	4	138.4 $\pm$ 11.7 <sup>abc</sup>	12.6 $\pm$ 0.9 <sup>abc</sup>
F 值		59.23	42.45
P 值		<0.001	<0.001

注:与对照组比较,<sup>a</sup> $P<0.05$ ;与模型组比较,<sup>b</sup> $P<0.05$ ;与中剂量 ISO 纳米体系组比较,<sup>c</sup> $P<0.05$ (单因素方差分析,LSD- $t$  检验) ISO:异槲皮苷;GSH-PX:谷胱甘肽过氧化物酶;SOD:超氧化物歧化酶

Note: Compared with the control group,<sup>a</sup> $P<0.05$ ; compared with the model group,<sup>b</sup> $P<0.05$ ; compared with the medium BSA@ISO@EXO group,<sup>c</sup> $P<0.05$  (One-way ANOVA, LSD- $t$  test) ISO: isoquercitrin; GSH-PX: glutathione peroxidase; SOD: superoxide dismutase

### 3 讨论

BSA 是一种天然蛋白质,广泛存在于生物体内,具有极低的免疫原性和细胞毒性,适合作为药物载体用于体内递送。其结构稳定,在生理条件下不易变性,可减少载体本身对细胞的潜在损伤。BSA 分子表面含有丰富的氨基(-NH<sub>2</sub>)、羧基(-COOH)和疏水腔,可通过氢键、疏水作用和离子键与 ISO 结合。EXO 的生物相容性和靶向递送能力是 BSA@ISO@EXO 体系高效抗氧化和抗炎的关键<sup>[13-15]</sup>。本研究通过超速离心法提取 ARPE-19 细胞株 EXO,并经 CD63、TSG101 和 CD9 标志物验证其高纯度和生物活性。

DR 病理机制中,氧化应激和炎症反应是导致 RPE 细胞损伤的关键因素<sup>[1,6]</sup>。ISO 作为一种天然黄酮类化合物,具有显著的抗氧化和抗炎特性,但其水溶性差及生物利用度低限制了临床应用<sup>[16]</sup>。BSA 作为载体的核心优势在于其生物相容性、药物增溶能力和可修饰性,与 EXO 复合后更能通过协同作用提高 ISO 的递送效率和靶向性,为 DR 的治疗提供了一种高效、安全的纳米递送策略。本研究通过构建 BSA@ISO@EXO 纳米体系,显著提高了 ISO 的溶解度和稳定性,ISO 包封率达 76.6%,负载率达 10.3%,并在 24 h 内

实现 75.1% 的药物释放,表明该体系具有良好的药物递送性能,而体内存在炎症和 ROS 的环境会进一步促进药物释放。这些特性得益于 EXO 的生物相容性和 EXO 自身具有 ROS 响应性,能够在高氧化应激环境中实现相对靶向释放,从而增强 ISO 的生物利用度。

BSA@ISO@EXO 纳米颗粒呈均匀球形,平均粒径约 39.6 nm,电位为 -13.4 mV,具有良好的物理稳定性。紫外可见光谱和红外光谱进一步证实 BSA、ISO 和 EXO 形成复合体系<sup>[17]</sup>。有研究显示,高糖环境通过诱导 RPE 细胞线粒体功能障碍及 ROS 过量生成,RPE 细胞通过分泌 VEGF 和炎症因子(如 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ )与血管内皮细胞和周细胞相互作用,调控微血管屏障功能和新生血管形成,与 DR 早期微血管损伤和神经退行性变密切相关<sup>[1,4-5]</sup>。本研究结果显示,中剂量 ISO 纳米体系组显著降低高糖环境下细胞 ROS 水平和炎症因子(TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ )浓度;且与单纯 ISO 组相比,BSA@ISO@EXO 显著降低了高糖诱导的 ARPE-19 细胞模型 ROS 水平,以中剂量 BSA@ISO@EXO (ISO 浓度 10  $\mu$ mol/L)效果最佳,细胞 ROS 水平降至接近对照组水平。以上结果表明 BSA@ISO@EXO 纳米体系通过膜融合和内吞作用提高 ISO 的细胞内递送效率,有效增强 ISO 的抗炎作用,为 DR 治疗提供了新策略。本研究预实验证实游离 BSA@ISO 在培养液中稳定性差(4 h 沉淀率>80%),而外泌体包封显著提高了其分散稳定性,延长药物作用时间,从而更高效地发挥抗氧化及抗炎效应。

本研究还发现,高剂量 BSA@ISO@EXO 在降低 ROS 和炎症因子水平方面劣于低剂量 BSA@ISO@EXO,且细胞活性下降,可能是因高浓度 ISO 可导致细胞损伤所致<sup>[18]</sup>。本研究中,与模型组比较,中剂量 ISO 纳米体系组抗氧化酶 GSH-PX 和 SOD 活性显著升高,且氧化应激标志物 MDA 水平明显下降。该结果表明 BSA@ISO@EXO 通过增强抗氧化酶活性、降低脂质过氧化,协同发挥抗氧化和抗炎作用。未来研究需进一步优化 ISO 剂量,探索其抗氧化、抗炎与促凋亡作用的平衡机制。

综上所述,本研究成功构建 BSA@ISO@EXO 体系,并通过 ARPE-19 细胞高糖模型验证了其在提高 ISO 生物利用度及发挥抗氧化和抗炎作用中的潜力。未来研究可进一步探索 BSA@ISO@EXO 在其他氧化应激相关眼科疾病中的应用,以及优化其药物动力学以延长作用时间。本研究中,BSA@ISO 因稳定性差易沉淀而未单独设组,外泌体包封显著提高了其分散性与药效持续性。今后需开展体内实验进一步验证其靶

向递送效果及临床转化潜力。本研究为 DR 的精准治疗提供了创新的纳米递送策略,为提高 ISO 生物利用度及抗氧化、抗炎治疗效果奠定了实验基础。

**利益冲突** 所有作者均声明不存在利益冲突

**作者贡献声明** 王梦华: 酝酿和设计实验、实施研究、对文章的知识性内容作批评性审阅及定稿; 胡芷柔: 实施研究、采集数据、统计分析、分析/解释数据, 起草文章

### 参考文献

[1] Tan TE, Wong TY. Diabetic retinopathy: looking forward to 2030 [J]. *Front Endocrinol (Lausanne)*, 2022, 13 : 1077669. DOI: 10. 3389/fendo. 2022. 1077669.

[2] Lin KY, Hsieh WH, Lin YB, et al. Update in the epidemiology, risk factors, screening, and treatment of diabetic retinopathy [J]. *J Diabetes Investig*, 2021, 12(8) : 1322-1325. DOI: 10. 1111/jdi. 13480.

[3] Modjtahedi BS, Wu J, Luong TQ, et al. Severity of diabetic retinopathy and the risk of future cerebrovascular disease, cardiovascular disease, and all-cause mortality [J]. *Ophthalmology*, 2021, 128 ( 8 ) : 1169-1179. DOI: 10. 1016/j. ophtha. 2020. 12. 019.

[4] Baker RG, Hayden MS, Ghosh S. NF- $\kappa$ B, inflammation, and metabolic disease [J]. *Cell Metab*, 2011, 13(1) : 11-22. DOI: 10. 1016/j. cmet. 2010. 12. 008.

[5] Dammak A, Huete-Toral F, Carpena-Torres C, et al. From oxidative stress to inflammation in the posterior ocular diseases: diagnosis and treatment [J]. *Pharmaceutics*, 2021, 13 ( 9 ) : 1376. DOI: 10. 3390/pharmaceutics13091376.

[6] Li X, Jiang Q, Wang T, et al. Comparison of the antioxidant effects of quercitrin and isoquercitrin: understanding the role of the 6"-OH group [J]. *Molecules*, 2016, 21 ( 9 ) : 1246. DOI: 10. 3390/molecules21091246.

[7] Sharma DS, Wadhwa S, Gulati M, et al. Recent advances in intraocular and novel drug delivery systems for the treatment of diabetic retinopathy [J]. *Expert Opin Drug Deliv*, 2021, 18(5) : 553-576. DOI: 10. 1080/17425247. 2021. 1846518.

[8] Al-Ani SA, Lee QY, Maheswaran D, et al. Potential of exosomes as multifunctional nanocarriers for targeted drug delivery [J]. *Mol Biotechnol*, 2024, DOI: 10. 1007/s12033-024-01268-6.

[9] Sharma A, Yadav A, Nandy A, et al. Insight into the functional dynamics and challenges of exosomes in pharmaceutical innovation and precision medicine [J]. *Pharmaceutics*, 2024, 16 ( 6 ) : 709. DOI: 10. 3390/pharmaceutics16060709.

[10] Hao Y, Gao X. Diosgenin protects retinal pigment epithelial cells from inflammatory damage and oxidative stress induced by high glucose by activating AMPK/Nrf2/HO-1 pathway [J/OL]. *Immun Inflamm Dis*, 2022, 10(12) : e698 [ 2025-06-16 ]. <http://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36444632>. DOI: 10. 1002/iid3. 698.

[11] Luo R, Li L, Xiao F, et al. LncRNA FLG-AS1 mitigates diabetic retinopathy by regulating retinal epithelial cell inflammation, oxidative stress, and apoptosis via miR-380-3p/SOCS6 axis [J]. *Inflammation*, 2022, 45(5) : 1936-1949. DOI: 10. 1007/s10753-022-01665-6.

[12] Hall MO, Abrams TA. RPE cells from normal rats do not secrete a factor which enhances the phagocytosis of ROS by dystrophic rat RPE cells [J]. *Exp Eye Res*, 1991, 52(4) : 461-464. DOI: 10. 1016/0014-4835(91)90043-e.

[13] Aiello LP, Pierce EA, Foley ED, et al. Suppression of retinal neovascularization *in vivo* by inhibition of vascular endothelial growth factor (VEGF) using soluble VEGF-receptor chimeric proteins [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1995, 92 ( 23 ) : 10457-10461. DOI: 10. 1073/pnas. 92. 23. 10457.

[14] Li X, Jiang Q, Wang T, et al. Comparison of the antioxidant effects of quercitrin and isoquercitrin: understanding the role of the 6"-OH group [J]. *Molecules*, 2016, 21 ( 9 ) : 1246. DOI: 10. 3390/molecules21091246.

[15] Al-Ani SA, Lee QY, Maheswaran D, et al. Potential of exosomes as multifunctional nanocarriers for targeted drug delivery [J/OL]. *Mol Biotechnol*, 2024 [ 2025-06-16 ]. <http://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32825644>. DOI: 10. 1007/s12033-024-01268-6. [ published online ahead of print ].

[16] Li C, Arakawa T. Application of native polyacrylamide gel electrophoresis for protein analysis: bovine serum albumin as a model protein [J]. *Int J Biol Macromol*, 2019, 125 : 566-571. DOI: 10. 1016/j. ijbiomac. 2018. 12. 090.

[17] Xie J, Hu Y, Su W, et al. PLGA nanoparticles engineering extracellular vesicles from human umbilical cord mesenchymal stem cells ameliorates polyethylene particles induced periprosthetic osteolysis [J]. *J Nanobiotechnology*, 2023, 21 ( 1 ) : 398. DOI: 10. 1186/s12951-023-02177-7.

[18] Martinez-Gil N, Vidal-Gil L, Flores-Bellver M, et al. Ethanol-induced oxidative stress modifies inflammation and angiogenesis biomarkers in retinal pigment epithelial cells ( ARPE-19 ) : role of CYP2E1 and its inhibition by antioxidants [J]. *Antioxidants ( Basel )*, 2020, 9(9) : 776. DOI: 10. 3390/antiox9090776.

( 收稿日期: 2025-05-15 修回日期: 2025-08-07 )

( 本文编辑: 张宇 骆世平 )



读者 · 作者 · 编者

## 本刊征稿启事

《中华实验眼科杂志》是由中国科学技术协会主管、中华医学会主办、河南省立眼科医院承办的眼科专业学术期刊,月刊,每月 10 日出版。本刊的报道范围主要为眼科基础和临床研究领域领先的科研成果,主要栏目设有专家述评、实验研究、临床研究、调查研究、综述、病例报告等,学术内容涉及眼科疾病的基因学研究、基因诊断和基因靶向治疗、眼科遗传学研究、分子生物学研究、眼科微生物学研究、眼科药物学研究、眼科生物材料研究、眼科表观遗传研究、眼科疾病的动物模型、眼科疾病的流行病学研究、眼科疾病的多中心或单中心随机对照临床试验、循证医学临床实践及眼科疾病的临床研究等。本刊拟刊出海外学者的中文或英文原创性论文或评述类文章,欢迎国内外眼科研究人员踊跃投稿。

## 本刊对稿件的学术要求

文稿须有较高的学术价值,具有创新性、科学性、导向性和实用性。文稿要求资料翔实、实事求是、立论新颖、方法学正确、论据充分、图表恰当、结果客观、结论可靠、论述严谨、符合逻辑、层次清晰、数据准确、语句通顺。

( 本刊编辑部 )