

· 实验研究 ·

工程化外泌体负载 A485 通过靶向抑制乳酸化效应对缺氧诱导病理性新生血管的抑制作用

范圆媛 罗雨凡 谢平 胡仔仲

南京医科大学第一附属医院眼科, 南京 210029

通信作者: 胡仔仲, Email: huzizhong@njmu.edu.cn

【摘要】 目的 构建负载 p300 抑制剂 A485 的工程化外泌体 A485@EV, 探讨其通过靶向抑制乳酸化效应减轻缺氧诱导的病理性新生血管的作用及机制。 **方法** 采用超声破膜法制备 A485@EV 并鉴定其标志物、形态和理化性质, 测定 A485 的封装率、负载率及释放曲线。将人脐静脉内皮细胞(HUVECs)及人小胶质细胞系 3(HMC3)分为对照组、游离 A485 组和 A485@EV 组, 于 1% O₂ 下培养 24 h 建立缺氧模型后向细胞培养体系中分别加入等体积的磷酸盐缓冲液(PBS)、游离 A485 或 A485@EV, 使游离 A485 的终浓度为 20 μmol/L, A485@EV 的终浓度为 20 μg/ml。采用 EdU 增殖实验、Transwell 迁移实验、体外成管实验检测各组 HUVECs 细胞增殖、迁移及成管情况; 采用 EdU 增殖实验、Transwell 迁移实验、划痕愈合实验及 Western blot 检测各组 HMC3 细胞增殖、迁移、愈合情况及环氧合酶-2(COX-2)蛋白表达水平。另选取 SPF 级健康 7 日龄雄性 C57BL/6J 小鼠 18 只, 建立氧诱导视网膜病变(OIR)小鼠模型, 采用随机数字表法将 OIR 小鼠分为对照组、游离 A485 组和 A485@EV 组, 每组 6 只, 分别于玻璃体腔内注射 1 μl PBS、1 mmol A485、1 μg A485@EV。采用免疫荧光检测视网膜无血管区、新生血管区面积以及内皮细胞及小胶质细胞的乳酸化水平。 **结果** 成功构建的 A485@EV 呈典型杯状结构, 平均粒径为 (167.0±70.6) nm, Zeta 电位为 -35.63 mV, 封装率和负载率分别为 (40.91±2.30)% 和 (20.45±1.15)%, 24 h 累积释放率约 73.1%。与对照组和游离 A485 组比较, A485@EV 组 HUVECs 的 EdU 阳性率、迁移细胞数及管腔形成能力均显著降低, 差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$); HMC3 细胞 EdU 阳性率、迁移细胞数、划痕愈合率及 COX-2 蛋白相对表达量亦显著降低, 差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$)。OIR 小鼠模型中, A485@EV 组无血管区及新生血管区面积均低于对照组和游离 A485 组, 差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$); A485@EV 组视网膜 IB4 阳性内皮细胞及 IBA1 阳性小胶质细胞的乳酸化荧光信号均明显弱于对照组和游离 A485 组。 **结论** 工程化外泌体负载 A485 可能通过靶向抑制乳酸化效应, 有效减轻缺氧诱导的血管内皮细胞成管及小胶质细胞活化, 从而抑制病理性新生血管形成。

【关键词】 病理性新生血管; 工程化外泌体; A485; 乳酸化效应

基金项目: 国家自然科学基金面上项目(82471095, 82371076); 江苏省人民医院医工交叉转化基金(QG202405); 江苏省研究生科研实践创新计划(26CXJH3416)

DOI: 10.3760/ema.j.cn115989-20260427-00191

Inhibitory effect of engineered exosomes loaded with A485 on hypoxia-induced pathological neovascularization by targeted inhibition of lactylation

Fan Yuanyuan, Luo Yufan, Xie Ping, Hu Zizhong

Department of Ophthalmology, The First Affiliated Hospital of Nanjing Medical University, Nanjing 210029, China

Corresponding author: Hu Zizhong, Email: huzizhong@njmu.edu.cn

【Abstract】 Objective To construct engineered exosomes loaded with the p300 inhibitor A485 (A485@EV) and to investigate their effects and mechanisms in inhibiting hypoxia-induced pathological neovascularization by targeting inhibition of lactylation. **Methods** A485@EV was prepared by sonication, and its markers, morphology and physical and chemical properties were identified. The encapsulation efficiency, loading efficiency and release profile of A485 were determined. Human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) and human microglial cell line 3 (HMC3) were divided into control group, free A485 group, and A485@EV group, and cultured under 1% O₂ for 24 hours to establish a hypoxia model. Then equal volumes of phosphate buffered saline (PBS), free A485 or A485@EV were added to the cell culture system correspondingly, so that the final concentration of free A485 and A485@EV was



20 $\mu\text{mol/L}$ and 20 $\mu\text{g/ml}$, respectively. EdU proliferation assay, Transwell migration assay, and tube formation assay were used to evaluate the proliferation, migration, and tube formation of HUVECs. EdU proliferation assay, Transwell migration assay, wound healing assay, and Western blot were used to evaluate the proliferation, migration, and wound healing of HMC3 as well as the cyclooxygenase-2 (COX-2) protein expression. Eighteen healthy 7-day-old male C57BL/6J mice were selected to establish an oxygen-induced retinopathy (OIR) model. The OIR mice were randomly divided into control group, free A485 group, and A485@EV group using the random number table method, with 6 mice in each group and mice received an intravitreal injection of 1 μl of PBS, 1 mmol A485, or 1 μg A485@EV, respectively. Avascular area, neovascular area, and the lactylation levels of retinal endothelial cells and microglia were detected by immunofluorescent imaging. The study protocol was approved by the Animal Ethics Committee of Nanjing Medical University (No. IACUC-2202032-1). **Results** The successfully constructed A485@EV exhibited a typical cup-shaped morphology, with a mean particle size of $(167.0 \pm 70.6)\text{nm}$, a zeta potential of -35.63 mV , an encapsulation efficiency of $(40.91 \pm 2.30)\%$, a loading efficiency of $(20.45 \pm 1.15)\%$, and a 24-hour cumulative release rate of approximately 73.1%. Compared with the control group and free A485 group, the EdU positive rate, the number of migrating cells and the tube formation ability of HUVECs in A485@EV group were significantly reduced (all $P < 0.05$). Compared with the control group and free A485 group, the EdU positive rate, the number of migrating cells, scratch healing rate and relative expression of COX-2 protein in HMC3 cells were also significantly reduced (all $P < 0.05$). In the OIR mouse model, avascular and neovascular areas were both lower in the A485@EV group than in the control and free A485 groups, with statistically significant differences (all $P < 0.05$). IB4-positive endothelial cells and IBA1-positive microglia showed markedly weaker fluorescence of lactylation in the A485@EV group than in the control and free A485 groups. **Conclusions** Engineered exosome loaded with A485 may attenuate hypoxia-induced endothelial cell tube formation and microglial activation by targeting inhibition of the lactylation effect, thereby inhibiting pathological neovascularization.

[Key words] Pathological neovascularization; Engineered exosomes; A485; Lactylation

Fund program: National Natural Science Foundation of China (82471095, 82371076); Scientific Research Project Support Program of the First Affiliated Hospital of Nanjing Medical University-Medicine-Engineering Integration Translational Fund (QG202405); Postgraduate Research & Practice Innovation Program of Jiangsu Province (26CXJH3416)

DOI: 10.3760/cma.j.cn115989-20260427-00191

病理性新生血管是多种缺血性视网膜疾病(如早产儿视网膜病变、增殖型糖尿病视网膜病变等)共同的病理特征和主要致盲原因^[1]。此类新生血管结构异常、脆性高,易导致反复出血、纤维增殖甚至牵拉性视网膜脱离。尽管临床上已采用抗血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)药物、激光光凝等治疗手段,但存在应答不佳、需反复注射或损伤视野等局限性^[2-3]。因此,探索独立于VEGF通路之外的新治疗靶点及高效的药物递送策略具有重要的临床意义。病理性新生血管的形成以血管内皮细胞的异常增殖、迁移和管腔形成为核心环节。在缺氧微环境中,血管内皮细胞中多种促血管生成因子上调,驱动内皮细胞病理性增殖、迁移,进而形成结构异常的新生血管^[4]。与此同时,视网膜小胶质细胞作为中枢神经系统常驻免疫细胞,在病理性新生血管形成中亦发挥关键调控作用^[5]。在缺氧刺激下,小胶质细胞被广泛激活并迁移至新生血管区域,通过激活环氧合酶-2(cyclooxygenase-2, COX-2)等炎性介质,进一步加

剧内皮细胞的活化及病理性新生血管形成^[6]。因此,同时干预血管内皮细胞及小胶质细胞功能可能成为抑制视网膜新生血管的更优策略。

乳酸化修饰是近年来新发现的一种由乳酸驱动的蛋白翻译后修饰方式,与细胞增殖、迁移及炎症反应密切相关^[7]。在眼科领域,越来越多的证据表明乳酸化修饰参与调控视网膜新生血管性疾病的发生和发展^[7-13]。缺氧条件下,内皮细胞和小胶质细胞无氧糖酵解增强,乳酸蓄积增多,随之升高的蛋白质乳酸化修饰水平加剧病理性新生血管生成^[9,13]。因此,靶向乳酸化修饰有望成为抑制视网膜病理性新生血管的新策略。A485是p300/CBP的选择性小分子抑制剂。p300已被鉴定为乳酸化修饰的关键“书写酶”,能够催化底物蛋白发生乳酸化修饰^[14],而A485可通过抑制p300活性有效下调乳酸化修饰水平。已有研究报道,A485在氧诱导视网膜病变(oxygen-induced retinopathy, OIR)模型中可部分抑制病理性新生血管形成^[9]。然而,A485水溶性差、生物利用度低,且缺乏

细胞靶向性,限制了其体内应用。

外泌体是细胞分泌的直径为30~200 nm的细胞外囊泡,具有低免疫原性、高生物相容性及天然的跨生物屏障能力,已成为理想的药物递送载体^[15]。通过工程化改造将小分子药物负载于外泌体中,可显著提高药物的稳定性、生物利用度及靶向递送效率^[16]。本研究拟构建负载A485的工程化外泌体A485@EV,通过体外缺氧细胞模型及体内OIR小鼠模型,系统探讨其对血管内皮细胞及小胶质细胞乳酸化修饰的调控作用及对病理性新生血管的抑制效果,旨在为DR的治疗提供新的思路和实验依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞及动物来源 高纯度人脐带间充质干细胞(human umbilical cord mesenchymal stem cells, HUMSCs)外泌体(CTE-05)购自北京恩泽康泰生物科技有限公司。人脐静脉内皮细胞(human umbilical vein endothelial cells, HUVECs)(ATCC-PCS-100-013)购自英国LGC Standards公司;人小胶质细胞系3(human microglia cell line 3, HMC3)(CL-0620)购自武汉普诺赛生命科技有限公司。SPF级健康7日龄雄性C57BL/6J小鼠18只,购自北京维通利华实验动物技术有限公司。所有动物实验操作均符合视觉与眼科学研究协会及实验动物管理与使用委员会的规定。研究方案经南京医科大学动物伦理委员会批准(批文号:IACUC-2202032-1)。

1.1.2 主要试剂及仪器 A485(美国Med Chem Express公司);内皮细胞培养基、胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)(美国Thermo Fisher公司);MEM培养基(武汉普诺赛生命科技有限公司);外泌体专用纯化试剂盒(Exo-spin™ mini, EX01-8)(英国Cell Guidance Systems公司);BCA蛋白定量试剂盒(江苏凯基生物技术股份有限公司);EdU细胞增殖检测试剂盒(上海碧云天生物技术有限公司);Transwell小室(孔径8 μm)、Matrigel基质胶(美国Corning公司);兔抗CD63抗体(25682-1-AP)、兔抗CD9抗体(20597-1-AP)、兔抗Calnexin抗体(10427-2-AP)、兔抗COX-2抗体(27308-1-AP)、兔抗β-tubulin抗体(66240-1-Ig)(武汉三鹰生物技术有限公司);兔抗乳酸化泛抗体(PTM-1401RM, 杭州景杰生物科技股份有限公司);FITC标记的IB4凝集素(美国Vector Laboratories公司);山羊抗IBA1抗体(ab289874, 英国Abcam公司);RIPA裂解液、蛋白酶抑制剂混合物、磷

酸酶抑制剂混合物、ECL化学发光显影液(苏州新赛美生物科技有限公司);PVDF膜(0.22 μm、0.45 μm, 德国Merck Millipore公司)。透射电子显微镜(transmission electron microscope, TEM)Tecnai 12(荷兰Philips公司);纳米颗粒跟踪分析仪(nanoparticle tracking analyzer, NTA)Nanosight LM10系统(英国Nanosight公司);Zetasizer Lab粒度及电位分析仪(英国Malvern Panalytical公司);CO₂培养箱(美国Thermo Fisher公司);Stellaris倒置荧光显微镜(德国徕卡显微系统公司);倒置光学显微镜(日本Olympus公司);凝胶电泳系统(Tanon 5200 Multi全自动化学发光/荧光图像分析系统, 上海天能生命科学有限公司)。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 HUVECs用含10% FBS的内皮细胞培养基、HMC3用含10% FBS的MEM培养基,于37℃、5% CO₂培养箱中培养,取对数生长期细胞用于实验。

1.2.2 外泌体鉴定 采用TEM观察外泌体形态;采用NTA检测外泌体粒径及浓度;采用Western blot法检测外泌体标志蛋白CD63、CD9及内质网标志蛋白Calnexin的表达。

1.2.3 A485@EV的制备与表征 采用超声负载法制备负载A485的工程化外泌体A485@EV。将A485溶于二甲基亚砜中配制成10 mmol/L储备液,与外泌体按质量比1:1混合,超声破膜3次(功率20%,工作3 s,冰上冷却3 s,持续2 min,每次结束后冰上冷却2 min),室温下恢复膜完整性1 h,外泌体专用纯化试剂盒提纯即可获得A485@EV。采用NTA检测A485@EV粒径及Zeta电位;采用TEM观察形态。采用差量法计算包封率及负载率:包封率(%)=包封的药物质量/药物投加量×100%;负载率(%)=包封的药物质量/(包封的药物质量+载体质量)×100%。在37℃条件下,以磷酸盐缓冲液(phosphate buffered saline, PBS)(pH 7.4)为释放介质,分别在4、8、12、16、20、24 h取样,采用透析法测定A485@EV的体外释放曲线。

1.2.4 细胞缺氧模型建立及实验分组 HUVECs及HMC3细胞以适宜密度接种后,待细胞融合至70%~80%时,置于缺氧培养箱(1% O₂、5% CO₂、94% N₂)中37℃培养24 h建立缺氧模型。将细胞分为对照组、游离A485组、A485@EV组,向细胞培养体系中分别加入等体积的PBS、游离A485或A485@EV,使游离A485的终浓度为20 μmol/L, A485@EV的终浓度(以EV含量计)为20 μg/ml。

1.2.5 EdU增殖实验检测 各组细胞增殖率 将HUVECs及HMC3细胞以5×10⁴个/孔接种于24孔板,



分组处理后,每孔加入50 $\mu\text{mol/L}$ EdU工作液,37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育2~6 h。4%多聚甲醛室温固定30 min,0.5% Triton X-100透化10 min,加入Click反应液室温避光孵育30 min,DAPI染核10 min。荧光显微镜下随机选取5个视野拍照,计算EdU阳性率。实验重复3次。

1.2.6 Transwell小室迁移实验检测各组迁移细胞数 HUVECs及HMC3细胞经分组处理后,消化重悬于无血清培养基中,调整细胞密度至 1×10^5 个/ml。取200 μl 细胞悬液加入Transwell上室,下室加入600 μl 含10% FBS的完全培养基,常规培养24 h后取出小室,棉签擦去上室未迁移细胞,4%多聚甲醛固定15 min,0.1%结晶紫染色20 min,PBS漂洗后显微镜下随机选取5个视野计数迁移细胞数。实验重复3次。

1.2.7 细胞划痕愈合实验检测各组划痕愈合率 HMC3细胞接种于6孔板,生长至融合单层后,用200 μl 枪头垂直划痕,PBS洗去脱落细胞。分组处理后,于0 h和24 h在倒置显微镜下拍照,采用ImageJ软件测量划痕面积,计算划痕愈合率,划痕愈合率(%)=(0 h划痕面积-24 h划痕面积)/0 h划痕面积 $\times 100\%$ 。实验重复3次。

1.2.8 体外成管实验检测各组管腔形成能力 将Matrigel基质胶按每孔20 μl 铺于预冷24孔板中,37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育30 min凝固。HUVECs经分组处理后,消化重悬,以 1.5×10^4 个/孔接种于Matrigel基质胶上。常规培养4~6 h后,倒置显微镜下观察管腔形成情况,随机选取5个视野拍照,采用ImageJ软件统计总节段数量、节段总长度、成环数量和总连接点数量。实验重复3次。

1.2.9 Western blot法检测各组各蛋白表达情况 收集各组细胞,加入RIPA裂解液(含蛋白酶抑制剂及磷酸酶抑制剂)冰上裂解30 min,12 000 $\times g$ 离心20 min取上清。BCA法测定蛋白浓度,取20 μg 蛋白进行SDS-PAGE电泳,转印PVDF膜,5%脱脂奶粉室温封闭1 h。分别加入兔抗CD63(1:10 000)、CD9(1:5 000)、Calnexin(1:10 000)、COX-2(1:1 000)及 β -tubulin(1:50 000)一抗,4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜;TBST洗膜3次,加入相应的HRP二抗室温孵育1 h。ECL显影液显影,采用ImageJ软件分析条带灰度值,以 β -tubulin为内参计算目的蛋白相对表达量。实验重复3次。

1.2.10 OIR小鼠模型建立及玻璃体腔注射 将7日龄C57BL/6J幼鼠与母鼠共同置于(75 $\pm$ 2)%高氧环境中饲养5 d后返回常氧环境诱导视网膜新生血管形成。采用随机数字表法将OIR小鼠分为对照组、游离A485组和A485@EV组,每组6只。各组分别于玻璃体腔内注射1 μl PBS、1 mmol A485或1 μg A485@EV。

1.2.11 免疫荧光染色及乳酸化共定位分析 OIR小鼠于17日龄时过量麻醉处死,摘取眼球,4%多聚甲醛固定2 h,分离视网膜。视网膜铺片经PBS漂洗后,用5%BSA室温封闭1 h。分别加入兔抗乳酸化泛抗体(1:200)与FITC-IB4(1:200)混合液或兔抗乳酸化泛抗体(1:200)与山羊抗IBA1(1:200)混合液,4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜。PBS漂洗后,加入相应荧光二抗室温避光孵育2 h。PBS漂洗,视网膜平铺于载玻片上,抗荧光淬灭剂封片。激光共聚焦显微镜下观察并拍照。采用ImageJ软件进行无血管区及新生血管面积定量分析。实验重复3次。

1.3 统计学方法

采用GraphPad Prism 10.6软件进行统计分析。计量资料经Shapiro-Wilk正态性检验证实符合正态分布,以 $\bar{x}\pm s$ 表示,各组各指标总体比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用Tukey检验。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组小鼠视网膜内皮细胞和小胶质细胞乳酸化修饰水平比较

免疫荧光染色结果显示,OIR组小鼠视网膜中IB4阳性内皮细胞和IBA1阳性小胶质细胞的乳酸化荧光信号强度均较对照组明显增强(图1)。

2.2 外泌体的鉴定及工程化外泌体的构建与表征

Western blot结果显示,外泌体及A485@EV均高表达外泌体标志蛋白CD63和CD9,而内质网标志蛋白Calnexin无明显表达(图2A)。NTA及TEM观察结果显示,外泌体和A485@EV粒径主要分布在30~200 nm范围内,外泌体平均粒径为(152.2 $\pm$ 52.8) nm,A485@EV平均粒径为(167.0 $\pm$ 70.6) nm,两者均呈典型的杯状囊泡结构(图2B)。Zeta电位检测结果显示,外泌体电位为-36.72 mV,A485@EV电位为-35.63 mV(图2C)。A485@EV的封装率和负载率分别为(40.91 $\pm$ 2.30)%和(20.45 $\pm$ 1.15)% (图2D)。体外释放曲线显示,A485@EV在24 h内累积释放率达73.1%(图2E)。

2.3 各组HUVECs细胞增殖、迁移和成管情况比较

对照组、游离A485组和A485@EV组HUVECs细胞EdU阳性率、迁移细胞数、总节段数量、节段总长度、成环数量、总连接点数量总体比较差异均有统计学意义($F=43.38$ 、53.74、31.69、26.47、18.91、37.40,均 $P<0.01$),其中A485@EV组上述指标均少于对照组和游离A485组,差异均有统计学意义(均 $P<0.05$)(图3,表1)。

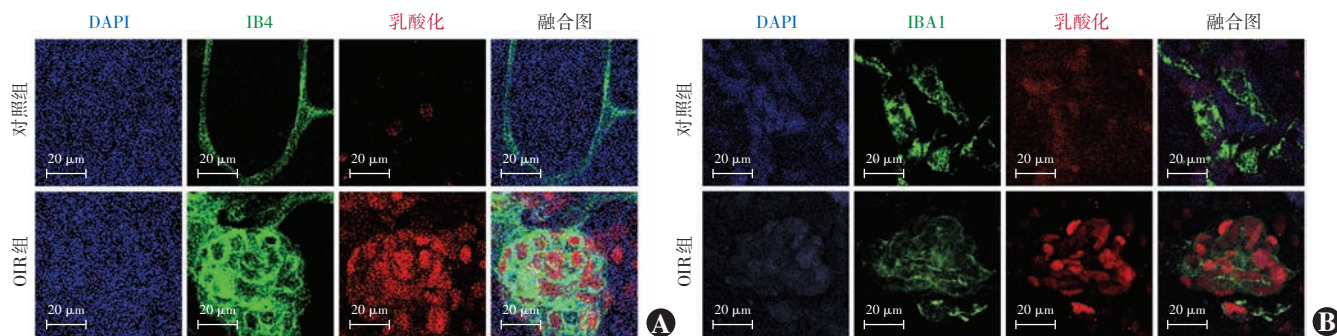


图1 各组小鼠视网膜内皮细胞和小胶质细胞乳酸化修饰水平(标尺=20 μm) A:内皮细胞(IB4,绿色)与乳酸化程度(红色)共定位情况 B:小胶质细胞(IBA1,绿色)与乳酸化程度(红色)共定位情况 OIR:氧诱导视网膜病变

Figure 1 Lactylation levels in mice retinal endothelial cells and microglia in each group (Scale bar=20 μm) A: Co-localization of endothelial cells (IB4, green) and pan-lactylation (red) B: Co-localization of microglia (IBA1, green) and pan-lactylation (red) OIR: oxygen-induced retinopathy

2.4 各组 HMC3 细胞增殖、迁移、划痕愈合情况及 COX-2 蛋白表达水平比较

对照组、游离 A485 组和 A485@EV 组 HMC3 细胞 EdU 阳性率、迁移细胞数、划痕愈合率、COX-2 蛋白相对表达量总体比较差异均有统计学意义 ($F=26.99$ 、 36.79 、 24.47 、 322.50 , 均 $P<0.01$), 其中 A485@EV 组 EdU 阳性率、迁移细胞数、划痕愈合率、COX-2 蛋白相对表达量均少于对照组和游离 A485 组, 差异均有统计学意义 (均 $P<0.05$) (图 4, 表 2)。

2.5 各组 OIR 小鼠视网膜乳酸化程度和无血管区及新生血管区面积比较

免疫荧光共定位结果显示, 对照组小鼠视网膜可见大量 IB4 阳性内皮细胞与乳酸化信号共定位; 游离 A485 组乳酸化程度较对照组有所减轻; A485@EV 组内皮细胞乳酸化信号最弱 (图 5A)。IBA1 阳性小胶质细胞与乳酸化信号共定位分析显示, A485@EV 组乳酸化程度明显低于对照组和游离 A485 组 (图 5B)。视网膜平铺片染色结果显示, 对照组、游离 A485 组和 A485@EV 组视网膜无血管区面积分别为 $(30.11\pm 2.65)\%$ 、 $(25.11\pm 2.10)\%$ 、 $(21.32\pm 2.12)\%$, 新生血管区面积分别为 $(25.81\pm 2.08)\%$ 、 $(16.72\pm 1.63)\%$ 、 $(13.52\pm 2.30)\%$, 总体比较差异均有统计学意义 ($F=21.98$ 、 59.59 , 均 $P<0.05$), 其中 A485@EV 组视网膜无血管区、新生血管区面积均明显低于对照组和游离 A485 组, 差异均有统计学意义 (均 $P<0.05$) (图 5C~E)。

3 讨论

近年来, 外泌体作为天然来源的纳米级细胞外囊泡, 凭借其低免疫原性、高生物相容性及跨越生物屏障的能力, 已成为眼科药物递送领域的研究热点^[18]。HUMSCs 具有良好的体外扩增能力, 便于实现外泌体的大规模、标准化生产, 同时, 间充质干细胞来源的外泌体本身具有抗炎、抗凋亡及组织修复功能^[19-21]。因此本研究采用超声破膜法将 p300 抑制剂 A485 负载于 HUMSCs 来源的外泌体中, 成功构建了理化性质稳定、纯度较高的工程化外泌体 A485@EV。

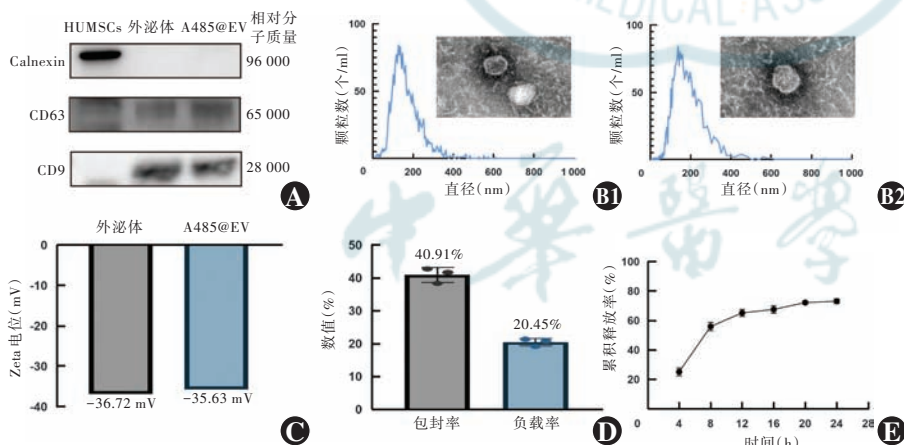


图2 外泌体的鉴定及工程化外泌体(A485@EV)的构建与表征 A:外泌体及A485@EV各标志物表达电泳图 CD63、CD9蛋白高表达,内质网标志物Calnexin无明显表达 B:外泌体及A485@EV粒径分布及TEM图(标尺=100 nm) B1:外泌体 B2:A485@EV C:外泌体及A485@EV平均Zeta电位 D:A485@EV的封装率和负载率 E:A485@EV释放曲线 HUMSCs:人脐带间充质干细胞;TEM:透射电子显微镜

Figure 2 Identification of exosomes and construction and characterization of engineered exosomes (A485@EV) A: Electrophoretogram of markers expression of exosomes and A485@EV CD63 and CD9 proteins were highly expressed and the endoplasmic reticulum marker Calnexin was not obviously expressed B: Size distribution and TEM images of exosomes and A485@EV (Scale bar=100 nm) B1: exosomes B2: A485@EV C: Average zeta potential of exosomes and A485@EV D: Encapsulation efficiency and loading efficiency of A485@EV E: Release profile of A485@EV HUMSCs: human umbilical cord mesenchymal stem cells; TEM: transmission electron microscopy

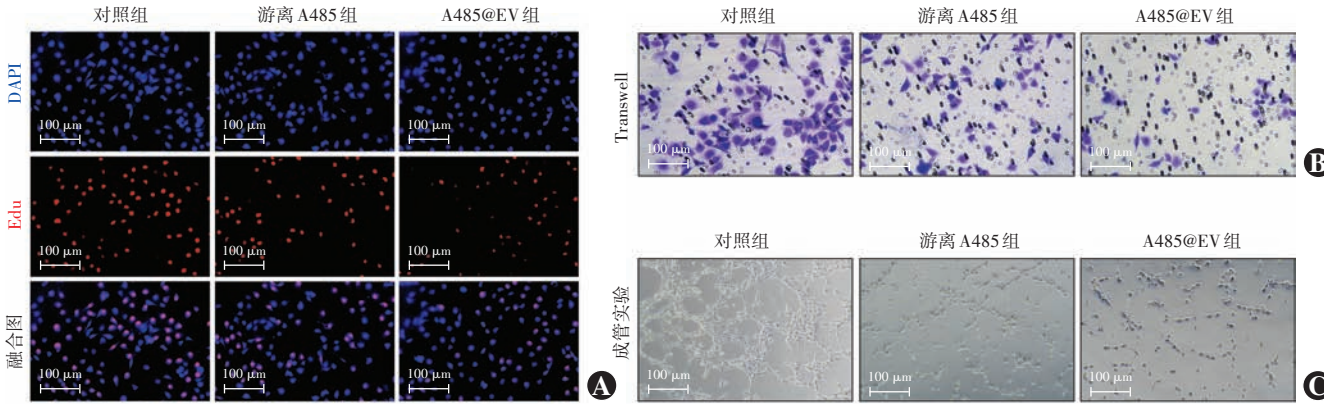


图3 各组HUVECs细胞增殖、迁移和成管情况 A:各组EdU增殖实验染色图(标尺=100 μm) B:各组细胞迁移图(结晶紫,标尺=100 μm) C:各组细胞成管情况(标尺=100 μm) HUVECs:人脐静脉内皮细胞
Figure 3 Proliferation, migration, and tube formation of different HUVECs group A: Staining images of EdU proliferation assay (Scale bar=100 μm) B: Representative images of Transwell migration assay (crystal violet, Scale bar=100 μm) C: Representative images of tube formation assay (Scale bar=100 μm) HUVECs: human umbilical vein endothelial cells

表1 各组HUVECs细胞增殖、迁移和成管情况比较($\bar{x}\pm s$)							
Table 1 Comparison of proliferation, migration, and tube formation of different HUVECs groups ($\bar{x}\pm s$)							
组别	样本量	EdU 阳性率(%)	迁移细胞数(个)	总节段数量	节段总长度(mm)	成环数量	总连接点数量
对照组	3	54.52±5.25	178.00±17.06	38.83±7.91	2.02±0.27	21.50±6.69	17.33±2.66
游离 A485 组	3	32.71±6.15 ^a	112.70±11.02 ^a	21.33±9.63 ^a	1.31±0.53 ^a	10.50±6.54 ^a	10.67±3.78 ^a
A485@EV 组	3	19.04±1.07 ^{ab}	75.67±6.11 ^{ab}	4.83±2.99 ^{ab}	0.43±0.28 ^{ab}	2.00±1.90 ^{ab}	3.33±1.51 ^{ab}
F 值		43.38	53.74	31.69	26.47	18.91	37.40
P 值		<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01

注:与对照组比较,^a $P<0.05$;与游离 A485 组比较,^b $P<0.05$ (单因素方差分析,Tukey 检验) HUVECs:人脐静脉内皮细胞
Note: Compared with control group, ^a $P<0.05$; compared with free A485 group, ^b $P<0.05$ (One-way ANOVA, Tukey test) HUVECs: human umbilical vein endothelial cells

本研究结果显示,在缺氧条件下,A485@EV可显著抑制 HUVECs 的 EdU 阳性率、Transwell 迁移细胞数及体外管腔形成能力,且其抑制效果优于游离 A485。既往研究表明,外泌体作为药物载体可减少药物在体内循环中的代谢和清除,提高药物生物利用度^[23],本研究结果与上述报道一致。这提示,外泌体作为递送载体可显著提高 A485 的细胞内递送效率,从而增强其对血管内皮细胞功能的调控效能。

除血管内皮细胞外,小胶质细胞在病理性新生血管形成中的关键作用近年来逐渐受到关注^[6]。在缺氧微环境中,视网膜小胶质细胞被广泛激活,并向新生血管区域迁移聚集,通过分泌多种促血管生成因子及炎性介质加剧血-视网膜屏障渗漏及病理性新生血管形成^[24]。本研究进一步观察了 A485@EV 对缺氧诱导的 HMC3 细胞功能的影响,结果显示 A485@EV 可显著抑制 HMC3 细胞增殖、迁移,并下调炎症相关蛋白 COX-2 的表达。上述结果表明,A485@EV 对缺氧诱导

的小胶质细胞活化亦具有显著的抑制作用,提示其兼具调控血管内皮细胞及小胶质细胞功能的双重效应。

翻译后修饰是蛋白质合成之后的化学修饰,在表观遗传学中起关键作用。2019 年,Zhang 等^[14]首次报道组蛋白赖氨酸乳酸化修饰可调节巨噬细胞活化过程中相关基因的表达。在眼科领域,乳酸化修饰可通过 p300/YY1^[9]、组蛋白 H3K18 乳酸化驱动的 NSUN2/m5C 轴^[13]以及组蛋白 H3K9 乳酸化促进 VEGF 通路等参与调控视网膜细胞炎症损伤和血管新生^[11]。研究表明,组蛋白乙酰转移酶 p300 可作为乳酸化修饰的关键调控因子,催化底物蛋白发生乳酸化修饰,加重氧糖剥夺/复氧后的细胞损伤^[25]。然而,A485 作为 p300 的选择性小分子抑制剂,能否通过外泌体包载靶向调控乳酸化修饰抑制病理性新生血管,尚未见报道。

本研究结果显示,相较于游离 A485,A485@EV 处理可更显著减小 OIR 小鼠模型中视网膜无血管区及新生血管区面积。共定位染色发现,A485@EV 组视网膜

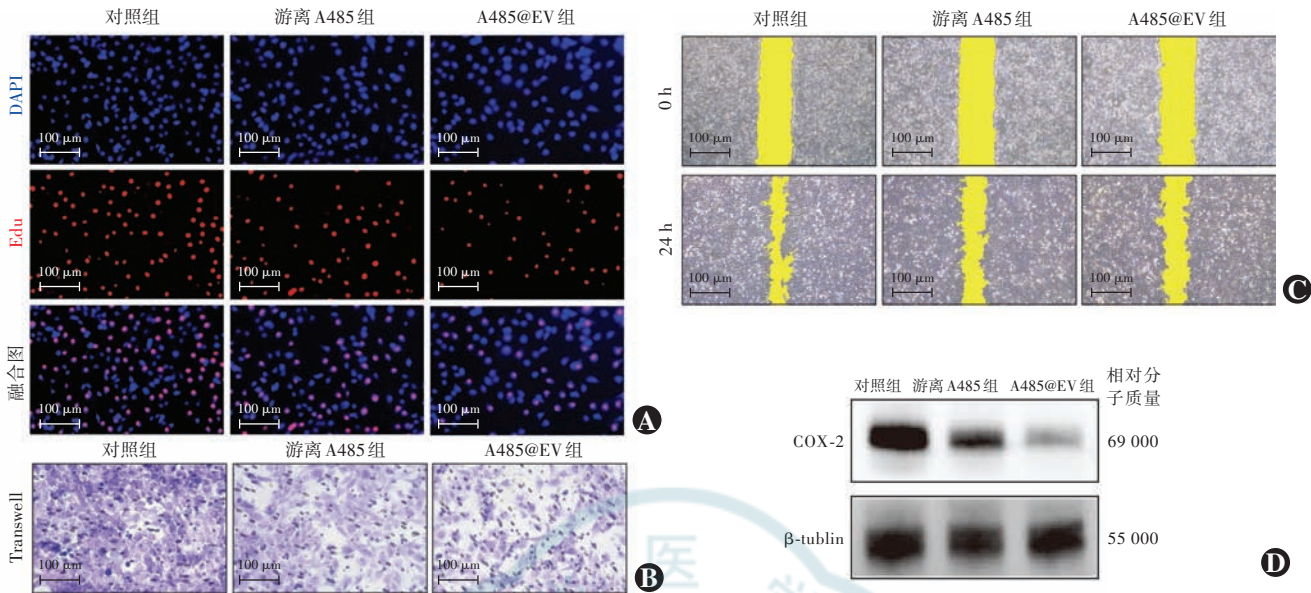


图4 各组HMC3细胞增殖、迁移、划痕愈合情况及COX-2蛋白表达 A:各组EdU增殖实验染色图(标尺=100 μm) B:各组细胞迁移图(结晶紫,标尺=100 μm) C:各组细胞划痕图(标尺=100 μm) D:各组细胞COX-2蛋白表达电泳图 HMC3:人小胶质细胞系3;COX-2:环氧合酶-2
Figure 4 Proliferation, migration, wound healing, and COX-2 expression in different HMC3 groups A: Staining images of EdU proliferation assay (Scale bar=100 μm) B: Representative images of Transwell migration assay (crystal violet, Scale bar=100 μm) C: Representative images of wound healing assay (Scale bar=100 μm) D: Electrophoretogram of COX-2 protein expression HMC3: human microglial cell line 3; COX-2: cyclooxygenase-2

表2 各组HMC3细胞增殖、迁移、划痕愈合情况及COX-2蛋白表达水平比较($\bar{x} \pm s$)
Table 2 Comparison of proliferation, migration, wound healing of HMC3 cells and COX-2 protein expression among different groups ($\bar{x} \pm s$)

组别	样本量	EdU 阳性率 (%)	迁移细胞数 (个)	划痕愈合率 (%)	COX-2 蛋白相对表达量
对照组	3	48.95±3.10	208.00±17.44	48.36±5.07	1.00±0.01
游离 A485 组	3	41.22±1.74 ^a	158.00±9.85 ^a	37.56±1.33 ^a	0.73±0.05 ^a
A485@EV 组	3	35.64±1.49 ^{ab}	118.70±9.45 ^{ab}	28.64±2.91 ^{ab}	0.40±0.01 ^{ab}
F 值		26.99	36.79	24.47	322.50
P 值		<0.01	<0.01	<0.01	<0.01

注:与对照组比较,^a $P<0.05$;与游离 A485 组比较,^b $P<0.05$ (单因素方差分析,Tukey 检验) HMC3:人小胶质细胞系3;COX-2:环氧合酶-2
 Note: Compared with control group, ^a $P<0.05$; compared with free A485 group, ^b $P<0.05$ (One-way ANOVA, Tukey test) HMC3: human microglial cell line 3; COX-2: cyclooxygenase-2

IB4 阳性内皮细胞及 IBA1 阳性小胶质细胞的乳酸化荧光信号均明显弱于对照组和游离 A485 组。结合前述功能实验结果,推测 A485@EV 可能通过外泌体介导的高效递送,增强 A485 对 p300 活性的抑制效应,进而下调 p300 介导的乳酸化修饰水平,同时协同间充质干细胞来源外泌体的抗炎、抗凋亡及组织修复等作用,最终减弱缺氧诱导的血管内皮细胞活化及小胶质细胞炎症反应,发挥对视网膜病理性新生血管的抑制作用。此外,游离 A485 虽能部分抑制上述病理过程,但效果显著弱于 A485@EV,进一步佐证了外泌体递送体系在提高药物生物利用度及靶向性方面的重要价值。

本研究仍存在一定局限性。首先,p300 作为一种乳酸化修饰“书写酶”,A485 对其活性的抑制可能导致多种底物蛋白及多个赖氨酸位点的乳酸化水平下调^[14,26-27]。本研究虽观察到 A485@EV 可抑制乳酸化修饰水平,但 p300 调控乳酸化修饰的具体分子靶点及下游信号通路尚未完全阐明,乳酸化修饰关键位点及 p300 下游底物需借助乳酸化修饰组学等技术进一步明确。其次,间充质干细胞来源外泌体自身对抗炎及抗血管新生作用的贡献无法完全排除。后续研究有必要增设空载外泌体组,以更精确地评估 A485 药物与外泌体载体各自的效应及协同作用。

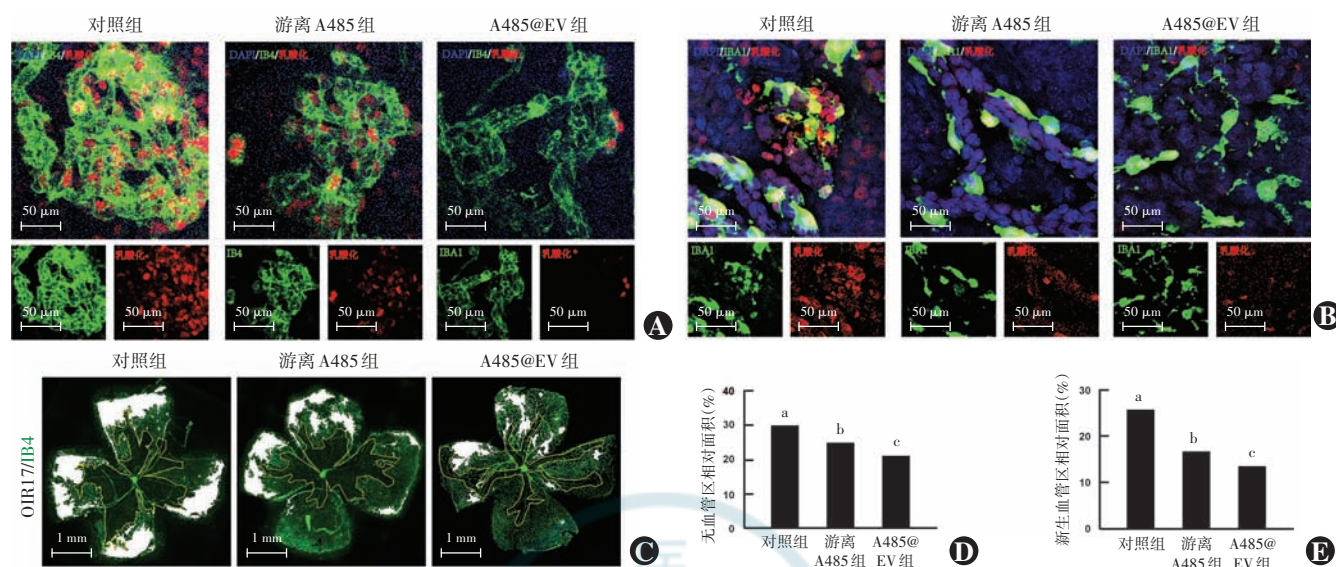


图5 各组 OIR 小鼠视网膜乳酸化程度和无血管区及新生血管区面积比较 A: 内皮细胞 (IB4, 绿色) 与乳酸化程度 (红色) 共定位情况 (标尺 = 50 μ m) B: 小胶质细胞 (IBA1, 绿色) 与乳酸化程度 (红色) 共定位情况 (标尺 = 50 μ m) C: 无血管区 (黄色实线圈出部分) 及新生血管区 (白色阴影覆盖部分) 分布情况 (标尺 = 1 mm) D: 各组小鼠视网膜无血管区面积比较 $F=21.98, P<0.05$. 与对照组比较, $^aP<0.05$; 与游离 A485 组比较, $^bP<0.05$ (单因素方差分析, Tukey 检验; $n=6$) E: 各组小鼠视网膜新生血管区面积比较 $F=59.59, P<0.05$. 与对照组比较, $^aP<0.05$; 与游离 A485 组比较, $^bP<0.05$ (单因素方差分析, Tukey 检验; $n=6$) OIR: 氧诱导视网膜病变

Figure 5 Comparison of the degree of lactylation and the areas of non-vascular and neovascular regions in OIR mice retina among different groups A: Co-localization of endothelial cells (IB4, green) and pan-lactylation (red) (Scale bar=50 μ m) B: Co-localization of microglia (IBA1, green) and pan-lactylation (red) (Scale bar=50 μ m) C: Avascular areas (outlined in yellow lines) and neovascular areas (covered in white shadow) (Scale bar=1 mm) D: Comparison of retinal avascular area $F=21.98, P<0.05$. Compared with control group, $^aP<0.05$; compared with free A485 group, $^bP<0.05$ (One-way ANOVA, Tukey test; $n=6$) E: Comparison of retinal neovascular area $F=59.59, P<0.05$. Compared with control group, $^aP<0.05$; compared with free A485 group, $^bP<0.05$ (One-way ANOVA, Tukey test; $n=6$) OIR: oxygen-induced retinopathy

综上所述,本研究成功构建了负载 A485 的工程化外泌体 A485@EV,证实其可通过靶向抑制乳酸化效应,有效减轻缺氧诱导的血管内皮细胞成管及小胶质细胞活化,从而抑制病理性新生血管形成。本研究为视网膜新生血管性疾病的治疗提供了新的靶点和递送策略,也为外泌体工程化改造在眼科药物递送领域的应用提供了实验依据。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

作者贡献声明 范圆媛:设计实验、实施研究、统计分析、起草文章;罗雨凡:实施研究、统计分析;谢平:对文章知识性内容作批评性审阅及修改;胡仔仲:参与选题、酝酿和设计实验、对文章知识性内容作批评性审阅及定稿

参考文献

- [1] Sheth JU, Stewart MW, Narayanan R, et al. Macular neovascularization [J]. *Surv Ophthalmol*, 2025, 70(4): 653–675. DOI: 10.1016/j.survophthal.2024.08.003.
- [2] Ng D, Ruamviboonsuk P, Apte RS, et al. International consensus and controversies on causes, diagnosis and management of diabetic macular edema (DME)[J]. *Prog Retin Eye Res*, 2025, 109: 101406. DOI: 10.1016/j.preteyeres.2025.101406.
- [3] Xu M, Fan R, Fan X, et al. Progress and challenges of anti-VEGF agents and their sustained-release strategies for retinal angiogenesis[J].

Drug Des Devel Ther, 2022, 16: 3241–3262. DOI: 10.2147/DDDT.S383101.

- [4] Chen DY, Sun NH, Chen X, et al. Endothelium-derived semaphorin 3G attenuates ischemic retinopathy by coordinating β -catenin-dependent vascular remodeling[J/OL]. *J Clin Invest*, 2021, 131(4): e135296[2026-04-22]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/33586674>. DOI: 10.1172/JCI135296.
- [5] Zhao B, Zhao Y, Sun X. Mechanism and therapeutic targets of circulating immune cells in diabetic retinopathy[J]. *Pharmacol Res*, 2024, 210: 107505. DOI: 10.1016/j.phrs.2024.107505.
- [6] Hu A, Schmidt M, Heinig N. Microglia in retinal angiogenesis and diabetic retinopathy[J]. *Angiogenesis*, 2024, 27(3): 311–331. DOI: 10.1007/s10456-024-09911-1.
- [7] Chai P, Zhao F, Jia R, et al. Lactate/lactylation in ocular development and diseases[J]. *Trends Mol Med*, 2025, 31(12): 1073–1076. DOI: 10.1016/j.molmed.2024.07.001.
- [8] 高艳, 茅希颖, 陈明康, 等. 乳酸在视网膜病变中的作用及机制研究进展[J]. *中华眼底病杂志*, 2024, 40(12): 975–979. DOI: 10.3760/cma.j.cn511434-20240731-00292.
- Gao Y, Mao XY, Chen MK, et al. Research progress on the role and mechanism of lactate in retinal diseases[J]. *Chin J Ocul Fundus Dis*, 2024, 40(12): 975–979. DOI: 10.3760/cma.j.cn511434-20240731-00292.
- [9] Wang X, Fan W, Li N, et al. YY1 lactylation in microglia promotes angiogenesis through transcription activation-mediated upregulation of FGF2[J]. *Genome Biol*, 2023, 24(1): 87. DOI: 10.1186/s13059-023-



- 02931-y.
- [10]Huang J, Wang X, Li N, et al. YY1 Lactylation aggravates autoimmune uveitis by enhancing microglial functions via inflammatory genes[J/OL]. *Adv Sci (Weinh)*, 2024, 11(19): e2308031[2026-04-22]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/38493498>. DOI: 10.1002/adv.202308031.
- [11]Fan W, Zeng S, Wang X, et al. A feedback loop driven by H3K9 lactylation and HDAC2 in endothelial cells regulates VEGF-induced angiogenesis[J]. *Genome Biol*, 2024, 25(1):165. DOI: 10.1186/s13059-024-03308-5.
- [12]Wang X, Huang J, Fan W, et al. Lactate-binding protein DNMT3A in HRMECs promotes angiogenesis by upregulating VEGFA through HIF-1 α lactylation[J]. *Genome Biol*, 2025, 26(1): 377. DOI: 10.1186/s13059-025-03845-7.
- [13]Zuo S, Li L, Tang J, et al. Lactylation-boosted m⁵C RNA modification drives choroidal neovascularization[J]. *Research (Wash D C)*, 2025, 8: 0913. DOI: 10.34133/research.0913.
- [14]Zhang D, Tang Z, Huang H, et al. Metabolic regulation of gene expression by histone lactylation[J]. *Nature*, 2019, 574(7779): 575-580. DOI: 10.1038/s41586-019-1678-1.
- [15]王梦华, 胡芷柔. 外泌体共载牛血清白蛋白联合异瓣皮苷纳米体系对高糖诱导人RPE细胞的保护作用及机制[J]. *中华实验眼科杂志*, 2025, 43(9): 794-800. DOI: 10.3760/cma.j.cn115989-20250515-00157. Wang MH, Hu ZR. Protective effects and mechanisms of exosomes co-loaded with BSA@ISO nanoparticles on high glucose-induced human retinal pigment epithelial cells[J]. *Chin J Exp Ophthalmol*, 2025, 43(9): 794-800. DOI: 10.3760/cma.j.cn115989-20250515-00157.
- [16]Fan Y, Ge P, Wang X, et al. Microglia-specific interleukin-4 delivery by engineered extracellular vesicles restores inner blood-retinal barrier in diabetic retinopathy via GAS6-MERTK pathway[J]. *J Nanobiotechnology*, 2025, 24(1):101. DOI: 10.1186/s12951-025-03976-w.
- [17]Hu Z, Wang J, Pan T, et al. The exosome-transmitted lncRNA LOC100132249 induces endothelial dysfunction in diabetic retinopathy [J]. *Diabetes*, 2023, 72(9): 1307-1319. DOI: 10.2337/db22-0435.
- [18]Ge P, Wang J, Xie P, et al. Exosomes in treating eye diseases: targeting strategies[J]. *Life Sci*, 2025, 371:123598. DOI: 10.1016/j.lfs. 2025. 123598.
- [19]Massoumi H, Katz EA, Alviar M, et al. Corneal nerve regeneration via MSC-derived EVs: tissue source and culture dimensionality dictate miRNA cargo and therapeutic efficacy[J/OL]. *Small*, 2026, 22(6): e07451[2026-04-22]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/41340474>. DOI: 10.1002/sml.202507451.
- [20]Zhou H, Liu Y, Zhou T, et al. IL-23 priming enhances the neuroprotective effects of MSC-derived exosomes in treating retinal degeneration[J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2024, 65(10): 8. DOI: 10.1167/iov.65.10.8.
- [21]Fan R, Su L, Zhang H, et al. Enhanced therapeutic effect of PEDF-loaded mesenchymal stem cell-derived small extracellular vesicles against oxygen-induced retinopathy through increased stability and penetrability of PEDF[J]. *J Nanobiotechnology*, 2023, 21(1):327. DOI: 10.1186/s12951-023-02066-z.
- [22]Clements JN, Mesawich J, Twisdale C. Current and emerging pharmacologic therapies for diabetic retinopathy[J/OL]. *Pharmacotherapy*, 2026, 46(3): e70119[2026-04-24]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/41693076>. DOI: 10.1002/phar.70119.
- [23]Guan J, Meng F, Wang C, et al. Recent advances in engineered exosome-based therapies for ocular vascular disease[J]. *J Nanobiotechnology*, 2025, 23(1):526. DOI: 10.1186/s12951-025-03589-3.
- [24]Wu Y, Wang J, Pan T, et al. Human lens epithelial-secreted exosomes attenuate ocular angiogenesis via inhibiting microglial activation[J]. *Exp Eye Res*, 2024, 241:109837. DOI: 10.1016/j.exer.2024.109837.
- [25]牛瑞蛟, 刘锦荟, 董怡, 等. 选择性脑亚低温对脑缺血再灌注损伤大鼠 p300 及乳酸化修饰的影响[J]. *中华危重病急救医学*, 2026, 38(2): 152-157. DOI: 10.3760/cma.j.cn121430-20240824-00414. Niu RJ, Liu JH, Dong Y, et al. Effect of selective cerebral mild hypothermia on p300 and lactylation modification in rats following cerebral ischemic reperfusion injury[J]. *Chin Crit Care Med*, 2026, 38(2):152-157. DOI: 10.3760/cma.j.cn121430-20240824-00414.
- [26]Lan W, Chen X, Yu H, et al. UGDH lactylation aggravates osteoarthritis by suppressing glycosaminoglycan synthesis and orchestrating nucleocytoplasmic transport to activate MAPK signaling[J/OL]. *Adv Sci (Weinh)*, 2025, 12(20):e2413709[2026-04-24]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/40150862>. DOI: 10.1002/adv.202413709.
- [27]Deng J, Li Y, Yin L, et al. Histone lactylation enhances GCLC expression and thus promotes chemoresistance of colorectal cancer stem cells through inhibiting ferroptosis[J]. *Cell Death Dis*, 2025, 16(1): 193. DOI: 10.1038/s41419-025-07498-z.

(收稿日期:2026-04-27 修回日期:2026-07-31)

(本文编辑:施晓萌 骆世平)

广告目次

瑞秀复(眼科用生物羊膜) 广州瑞泰生物科技有限公司……封二

镜净®GP硬性接触镜护理消毒仪 广州瑞泰生物科技有限公司……前插3正

中华医学期刊APP 《中华医学杂志》社有限责任公司……前插页3反

沃丽汀(卵磷脂络合碘片) 广东泰恩康医药股份有限公司……封三

中华医学期刊全文数据库 《中华医学杂志》社有限责任公司……封底

