

载地塞米松/卡托普利免疫纳米微粒调控肾小球肾炎小鼠中巨噬细胞极化的研究

李贤哲¹, 周柳廷², 赵越³, 刘天庆⁴, 刘红梅¹, 何黎黎¹, 袁志翔¹, 韩露^{1,5*}

(1. 西南民族大学药学院, 四川 成都 610225; 2. 四川农业大学动物医学院, 四川 成都 611134; 3. 四川天府新区人民医院药剂科, 四川 成都 610213; 4. 澳大利亚昆士兰医学研究院, 昆士兰 赫斯顿 4006; 5. 发育与妇儿疾病四川省重点实验室, 四川 成都 610041)

摘要: 本研究旨在制备共载地塞米松 (dexamethasone, DXMS) 和卡托普利 (captopril, CAP) 的脂质体包被的聚乳酸-羟基乙酸共聚物 [poly(lactic-co-glycolic acid), PLGA] 纳米粒, 并在纳米粒表面修饰聚乙二醇和 integrin $\alpha 8$ 抗体以得到载双药的核壳型免疫脂质体复合纳米粒 (DXMS/CAP@PLGA-ILs), 然后研究该载药纳米粒的肾脏靶向性、抗炎效果及对巨噬细胞分化的影响。结果表明, 该纳米粒粒径为 115.9 ± 2.89 nm, 粒径均一, 在电镜下能观察到壳核结构, DXMS载药量为 $5.72\% \pm 0.37\%$, CAP载药量为 $7.51\% \pm 0.07\%$ 。体外细胞实验结果表明, DXMS/CAP@PLGA-ILs可降低M2型巨噬细胞特异性细胞因子的分泌和标志物的RNA表达水平, 并促使M2型巨噬细胞往未极化的巨噬细胞方向分化。体内实验表明, DXMS/CAP@PLGA-ILs具有显著的肾靶向性, 可使系膜增生性肾小球肾炎小鼠的肾指数、血肌酐和尿素氮水平恢复正常, 减少肾脏中炎症细胞因子的分泌, 并降低肾脏中M1型和M2型巨噬细胞标志物的RNA表达量。动物福利及实验过程均遵循四川农业大学动物伦理委员会的规定。综上所述, 肾靶向性DXMS/CAP@PLGA-ILs纳米粒可有效调控巨噬细胞的极化, 起到“抗炎/抗纤维化”的治疗效果, 为肾小球肾炎的靶向治疗提供新的策略和依据。

关键词: 肾小球肾炎; 巨噬细胞极化; 肾脏靶向; 地塞米松; 卡托普利

中图分类号: R945 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2022)08-2388-11

Role of dexamethasone/captopril co-loaded immunoliposome-nanoparticle hybrids on the regulation of macrophage polarization in mice with glomerulonephritis

LI Xian-zhe¹, ZHOU Liu-ting², ZHAO Yue³, LIU Tian-qing⁴, LIU Hong-mei¹, HE Li-li¹,
YUAN Zhi-xiang¹, HAN Lu^{1,5*}

(1. College of Pharmacy, Southwest Minzu University, Chengdu 610225, China; 2. College of Veterinary Medicine, Sichuan Agricultural University, Chengdu 611134, China; 3. Department of Pharmacy, Sichuan Tianfu New Area People's Hospital, Chengdu 610213, China; 4. Queensland Institute of Medical Research, Herston 4006, Australia; 5. Development and Related Diseases of Women and Children Key Laboratory of Sichuan Province, Chengdu 610041, China)

Abstract: In this study, dexamethasone (DXMS) and captopril (CAP) were co-loaded into poly(lactic-co-glycolic acid) (PLGA) nanoparticles with a surface coating of a phospholipid bilayer, and then the core-shell nanoparticles were modified with polyethylene glycol and integrin $\alpha 8$ antibody to obtain immunoliposome-

收稿日期: 2022-05-11; 修回日期: 2022-06-20.

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81973265, 82003683); 四川省中医药管理局科学技术研究专项 (2021MS030); 西南民族大学研究生创新型科研项目 (ZD2022408); 发育与妇儿疾病四川省重点实验室开放课题资助项目 (2022001).

*通讯作者 Tel: 86-28-85658343, E-mail: lunahan@swun.edu.cn

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2022-0568

nanoparticle hybrids (DXMS/CAP@PLGA-ILs). The role of nanoparticles on the renal targeting, anti-inflammatory effects, and macrophage differentiation were investigated. The results showed that the particle size of the nanoparticles was 115.9 ± 2.89 nm, and the core-shell structure could be observed under an electron microscope. The drug loading capacity of DXMS and CAP was $5.72\% \pm 0.37\%$ and $7.51\% \pm 0.07\%$, respectively. The results of *in vitro* experiments showed that DXMS/CAP@PLGA-ILs could reduce the secretion of specific cytokines and the mRNA expression of markers in M2-type macrophages, thus promoting the differentiation of M2-type macrophages in the direction of unpolarized macrophages. *In vivo* experiments in mice showed that DXMS/CAP@PLGA-ILs had a significant renal targeting effect, which could restore the renal index, serum creatinine, and urea nitrogen levels of mesangial proliferative glomerulonephritis in mice. Moreover, DXMS/CAP@PLGA-ILs could reduce both the secretion of inflammatory cytokines and the mRNA expression levels of M1 and M2 macrophage markers in the kidney. All the animal experiments were in accordance with the regulations of Animal Ethics Committee of Sichuan Agricultural University. In conclusion, renal-targeting DXMS/CAP@PLGA-ILs could effectively regulate the polarization of macrophages and had an "anti-inflammatory/anti-fibrosis" therapeutic effect, providing a new strategy and basis for the targeted therapy of glomerulonephritis.

Key words: glomerulonephritis; macrophage polarization; renal targeting; dexamethasone; captopril

慢性肾病 (chronic kidney disease, CKD) 是世界性的重大疾病之一, 其患病率逐年上升, 且死亡率居高不下^[1]。慢性肾小球肾炎 (chronic glomerulonephritis, CGN) 是CKD的主要疾病, 是我国和世界范围内终末期肾病的主要病因之一^[2]。美国肾病协会的报道指出, CGN的基本病理过程包括肾小球系膜细胞 (mesangial cells, MCs) 增生及成纤维化, 这是CGN进展到终末期肾病的基本步骤, 也是肾脏纤维化的早期病灶。同时, 本课题组前期的研究也提示针对MCs设计一种新型肾脏靶向递药系统对治疗CGN有很大的优势^[3,4]。

CGN的早期阶段是由于炎症和免疫细胞的激活, 伴随疾病发展, 许多免疫复合物的持续刺激诱发慢性持续性的炎症, 这就引发了巨噬细胞的异常反应并造成其表型极化失衡, 从而病程发展由炎症转为肾纤维化, 并伴有细胞外基质过度沉积, 最终导致肾小球硬化^[5]。研究表明^[6], 在肾损伤初期, MCs会分泌多种细胞因子与炎症介质, 巨噬细胞会被招募到炎症部位并极化为M1型促炎性巨噬细胞, 诱导周围细胞凋亡, 还会通过诱导型一氧化氮合酶 (inducible nitric oxide synthase, iNOS) 释放促炎物质如肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α) 和大量一氧化氮, 从而引起局部组织损伤。当巨噬细胞吞噬了凋亡细胞及其他抗炎信号时, 巨噬细胞可向抗炎或促纤维化的M2型巨噬细胞极化, 并分泌白介素-10 (interleukin-10, IL-10)、精氨酸酶-1 (arginase-1, Arg-1)、生长转化因子- β (transforming growth factor- β , TGF- β) 和血红素加氧酶-1等因子来控制炎症^[7,8]。然而M2型巨噬细胞是一把双刃剑, 抗炎表型对损伤组织的修复至关重要, 如果它持续存在于组织修复过程中, 则会导致肾纤维化的发展^[9-11]。由此可见, 对CGN病理过程中巨噬细胞极

化的调控可避免肾纤维化的产生。

地塞米松 (dexamethasone, DXMS) 是目前临床常用于治疗肾脏疾病的一种长效糖皮质激素, 属于非特异性炎症介质拮抗剂, 具有强大的抗炎作用以改善CGN临床症状^[12-14]。卡托普利 (captopril, CAP) 作为一种人工合成的血管紧张素转换酶抑制剂, 可有效抑制肾脏纤维化和瘢痕的形成^[15]。血管紧张素II是肾素-血管紧张素系统的主要血管活性物质, 可直接调控TGF- β 1基因转录系统, 使TGF- β 1表达增加而促进肾脏纤维化的进程, 而CAP作为血管紧张素转换酶抑制剂, 既可减轻炎症反应, 也可直接有效抑制TGF- β 1的产生, 达到一定的抗纤维化作用^[16,17]。因此, 将DXMS和CAP两种药物共同靶向递送至MCs部位有望针对CGN实现抗炎、抗纤维化的双重作用。

本课题组前期研究发现, 聚乙二醇 (polyethylene glycol, PEG) 和 integrin α 8 抗体共修饰的功能化壳核结构纳米载体对小鼠MCs具有良好的靶向效果^[18,19]。本研究旨在制备载DXMS和CAP两种药物的壳核型免疫脂质体复合纳米粒 (DXMS/CAP@PLGA-ILs), 考察其理化性质, 并探究纳米粒对巨噬细胞极化的影响及其体内抗炎抗纤维化的效果。

材料与方法

仪器 1260 Infinity II 高效液相色谱仪 (安捷伦科技有限公司); Nano ZS ZEN3600 型激光粒度及电位分析仪 (长沙艾克赛普仪器设备有限公司); Varioskan Flash 多功能荧光化学发光免疫仪 (北京昊诺斯科技有限公司); PCR 仪、Chem DocMP 成像系统 (伯乐生命医学产品有限公司)。

试剂 PLGA [poly(lactic-co-glycolic acid), 75:25,

M_n 4 000~15 000]、维生素 E 聚乙二醇琥珀酸酯 (tocopherol polyethylene glycol succinate, TPGS)、2-亚氨基硫烷盐酸盐 (2-iminothiolane hydrochloride, 2-IT)、胆固醇 (Sigma-Aldrich 公司); DXMS (纯度 $\geq 99\%$)、CAP (纯度 $> 99\%$) (北京索莱宝科技有限公司); DSPE-PEG2000 (1, 2-distearoyl-*sn*-glycero-3-phosphoethanolamine-*N*-[methoxy(polyethylene glycol)-2000])、DSPE-PEG2000-Mal (DSPE-PEG2000-maleimide) (Laysan Bio 公司); integrin $\alpha 8$ 抗体 (Santa Cruz 公司); 竹叶青蛇毒素 (habu snake venom, HSV, 和光纯药工业株式会社); Cy5.5 荧光染料 (AAT Bioquest 公司); TNF- α 、TGF- β 、IL-6、IL-10 ELISA 试剂盒 (天根生化科技有限公司); 荧光定量 PCR 试剂盒 (Biosharp 公司); 反转录试剂盒 (北京全式金生物技术有限公司)。其余试剂均为分析纯。

动物和细胞 小鼠 RAW264.7 细胞于上海细胞库购买。细胞培养条件: 使用高糖型 DMEM 完全培养基 (Gibco 公司), 于 $37\text{ }^\circ\text{C}$ 、 5% CO_2 培养箱中培养。

SPF 级昆明品系小鼠 (雄性, 5 周龄, 体重 $20 \pm 2\text{ g}$) 购买于成都达硕生物科技有限公司, 合格证号: No. 51203500016551, 许可证号: SYXK (川) 2014-187, 于四川农业大学动物医学院动物房饲养。按第八版《实验动物饲养管理和使用指南》(上海科学技术出版社出版) 规定条款饲养及使用。动物福利及实验过程均遵循四川农业大学动物伦理委员会的规定。

DXMS@PLGA 的制备 为实现良好的肾小球 MCs 靶向, 纳米粒的粒径需控制在 $70\sim 130\text{ nm}$ ^[20,21]。本研究选用纳米沉淀法制备载药纳米粒^[22]。取 3 mg DXMS、 3 mg TPGS 和 10 mg PLGA 溶于 3 mL 丙酮中混合后作为有机相溶液, 再将有机相缓慢滴加至 15 mL 1% 的泊洛沙姆 188 水相溶液中, 室温下涡旋搅拌 15 min 后, 于 $37\text{ }^\circ\text{C}$ 旋转蒸发除去有机相。用针式过滤器去除较大纳米粒后将溶液于 $8\text{ 000 r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 5 min , 取上清液继续以 $12\text{ 000 r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 10 min , 收集沉淀加入 10 mL 去离子水重悬, 即得 DXMS@PLGA 纳米粒。同法可制备得到不载 DXMS 的空白 PLGA 纳米粒。

DXMS/CAP@PLGA-LNHys 的制备 不含靶向抗体的载双药的脂质体复合纳米粒 (DXMS/CAP@PLGA-LNHys) 采用薄膜分散法、水浴脱膜法和挤出法制备^[22-24]。首先精密称取 2 mg DSPE-PEG2000、 0.5 mg DSPE-PEG2000-Mal、 16 mg 大豆磷脂、 4 mg 胆固醇 (摩尔比 $0.08:0.02:1:1$)、 7.9 mg TPGS 于 250 mL 圆底烧瓶中, 加入 10 mL 三氯甲烷溶解, 在 $50\text{ }^\circ\text{C}$ 下旋蒸除去三氯甲烷, 形成均一薄膜。精密称取 10 mg CAP 加入 10 mL DXMS@PLGA 纳米粒胶体溶液中溶解后, 转入已形成薄膜的圆底烧瓶中, 水化脱膜后将该溶液探头超声

处理 (功率 75% , 时间 3 min , 超声 10 s , 间隔 10 s), 得到 DXMS/CAP@PLGA-LNHys。同时使用不载 DXMS 的空白 PLGA 纳米粒制备 CAP@PLGA-LNHys 纳米粒, 备用。

DXMS/CAP@PLGA-ILs 的制备 精密称取一定量 2-IT 溶于 $10\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ HEPES 缓冲液 (除去氧气, $\text{pH } 8.0$) 中, 配制得到 2-IT 溶液 ($3.75\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)。再将 integrin $\alpha 8$ 抗体 ($200\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) 与 2-IT 溶液按 $1:100$ 摩尔比孵育 1 h , 以活化 integrin $\alpha 8$ 抗体^[25]。取活化后的抗体溶液于 $4\text{ }^\circ\text{C}$ 透析 4 h , 透析液为 $10\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ HEPES 缓冲液 ($\text{pH } 7.4$)。最终将 2 mL DXMS/CAP@PLGA-LNHys 胶体溶液与纯化后的 1 mL 抗体溶液加入无菌离心管, $37\text{ }^\circ\text{C}$ 避光孵育过夜, 即得 DXMS/CAP@PLGA-ILs 纳米粒^[26,27], 备用。

纳米粒理化性质表征 将 DXMS@PLGA、DXMS/CAP@PLGA-LNHys 和 DXMS/CAP@PLGA-ILs 纳米粒使用激光粒度仪分别检测其粒径、电位及多分散系数 (polydispersity index, PDI)。取适量样品滴至铜网上待其铺展后, 再滴加 2% 的磷钨酸对样品进行 30 s 染色, 待干燥后置于透射电镜下观察, 使用透射电子显微镜观察 DXMS/CAP@PLGA-ILs 的形态及大小。

载药量的测定 制备好的 DXMS/CAP@PLGA-ILs 纳米粒以 $12\text{ 000 r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 15 min , 收集沉淀, 干燥称重后加入甲醇超声破乳使包载的药物完全释放。通过高效液相色谱法 (high performance liquid chromatography, HPLC) 分别测定样品中 DXMS 和 CAP 含量。DXMS 色谱条件: 色谱柱为 Agilent-C18 ($4.6\text{ mm} \times 250\text{ mm}$, $5\text{ }\mu\text{m}$), 检测波长 240 nm , 柱温 $40\text{ }^\circ\text{C}$, 流动相为乙腈:水 = $28:72$, 进样量 $10\text{ }\mu\text{L}$, 流速 $1.0\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ 。CAP 色谱条件: 色谱柱为 Agilent-C18 ($4.6\text{ mm} \times 250\text{ mm}$, $5\text{ }\mu\text{m}$), 检测波长 215 nm , 柱温 $40\text{ }^\circ\text{C}$, 流动相为甲醇:磷酸二氢钠 ($0.01\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$, $\text{pH } 3.0$) = $25:5:70$, 进样量 $10\text{ }\mu\text{L}$; 流速 $1.0\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ 。将计算出的 DXMS 和 CAP 含量分别记为 W_1 、 W_2 , 用于测定的 DXMS/CAP@PLGA-ILs 纳米粒实际质量记为 W 。依照下述公式 (1)、(2) 计算 DXMS/CAP@PLGA-ILs 的载药量 (drug loading, DL)。

$$\text{DL}\% (\text{DXMS}) = \frac{W_1}{W} \times 100\% \quad (1)$$

$$\text{DL}\% (\text{CAP}) = \frac{W_2}{W} \times 100\% \quad (2)$$

体外药物释放 使用透析法对纳米粒的体外释放进行考察。以磷酸盐缓冲液 (phosphate buffer saline, PBS, $\text{pH } 7.4$) 作为释放介质, 分别取 2 mL 制备好的纳米粒加入透析袋中, 再往各自的透析袋中加入 3 mL

PBS, 透析袋两头扎紧后置于 95 mL PBS 中, 温度为 37 °C, 分别于 0、0.5、1、2、4、8、12、24 h 时取样 1 mL, 同时补加新鲜介质, 用 HPLC 分别测定各个时间点游离的 DXMS、游离的 CAP、DXMS@PLGA、CAP@PLGA-LNHys 及 DXMS/CAP@PLGA-ILs 中药物的释放量, 绘制释放曲线。

体外细胞毒性 采用细胞计数试剂盒-8 (cell counting kit-8, CCK-8) 法评价纳米粒毒性。将细胞悬液 (每毫升 1×10^6 个) 用 96 孔板铺板培养 4 h, 移除培养液, 分别加入 90 μL 浓度为 $1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ (以 PLGA 浓度计) 的 PLGA-LNHys 或 PLGA-ILs 的培养液, DXMS 和 CAP 的浓度分别为 40、80 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。细胞培养 24 h 后, 每孔加入 10 μL CCK-8 储液并继续培养 3 h 后, 采用多功能荧光化学发光免疫仪在 450 nm 处测定吸光度 (A) 值。

为进一步确定 DXMS/CAP@PLGA-ILs 纳米粒的细胞毒性, 设置不同浓度梯度的纳米粒 (DXMS 质量浓度为 2.5、5、10、20、40 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) 进行考察, 后续操作同上。对照孔: 仅含细胞、完全培养液和 CCK-8。空白孔: 含完全培养液和 CCK-8。细胞存活率按照公式 (3) 计算:

$$\text{Cell viability}/\% = \frac{A_{\text{sample}} - A_{\text{blank}}}{A_{\text{control}} - A_{\text{blank}}} \times 100\% \quad (3)$$

细胞因子测定 通过 IL-10 刺激 RAW264.7 细胞来建立体外 M2 型巨噬细胞极化模型^[28,29], 以 M1 型巨噬细胞特异性表达的 TNF- α 和 M2 型巨噬细胞特异性表达的 TGF- β 这两个指标来筛选 IL-10 的最佳造模浓度。通过 ELISA 试剂盒测定两种细胞因子的分泌量, 筛选得到 100 $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的 IL-10 刺激 RAW264.7 极化为 M2 型巨噬细胞的效果最佳, 选用该浓度作为后续实验体外细胞造模浓度。

RAW264.7 细胞于 12 孔板中铺板培养 4 h 后, 除空白对照组外均加入终浓度为 100 $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的 IL-10, 空白组加入相应体积的完全培养基, 培养 24 h, 再分别向各组加入 DXMS/CAP@PLGA-ILs 和 DXMS/CAP@PLGA-LNHys, 使 DXMS 终浓度为 0.1 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, CAP 终浓度为 0.2 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。培养 24 h 后收集细胞培养液上清, 利用 ELISA 试剂盒检测上清中 TNF- α 、IL-6、TGF- β 、IL-10 细胞因子的表达。

巨噬细胞标记物的 mRNA 水平测定 按照“细胞因子测定”项的相同步骤对 RAW264.7 细胞进行造模和分组治疗后, 弃去孔板中的培养液, PBS 洗涤, 向每孔中加入 1 mL 细胞裂解液, 反复吹打使其充分裂解, 直至细胞悬液澄清。于 -20 °C 放置 5 min 使核酸和蛋白复合物分离, 再于 4 °C、12 000 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 5 min, 提

取上清到无 RNA 酶的离心管中。使用 RT-PCR 仪对巨噬细胞 M1 的标志物 iNOS、CD86 和巨噬细胞 M2 的标志物 Arg-1、CD163 的 mRNA 表达水平进行测定。所用引物序列见表 1。RT-PCR 反应结束后, 以 3-磷酸甘油醛脱氢酶 (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH) 为内参基因, 以空白组为对照, 采用 $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ 法分析基因的相对表达测定 iNOS、CD86、Arg-1 和 CD163 mRNA 的相对表达量。

Table 1 Primer sequences for real-time polymerase chain reaction. GAPDH: Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase; iNOS: Inducible nitric oxide synthase; CD: Cluster of differentiation; Arg-1: Arginase-1

Gene	Direction	Primer sequence (5'-3')
GAPDH	Forward	GGTGAAGGTCGGTGTGAACG
	Reverse	CTCGCTCCCTGGAAGATGGTG
iNOS	Forward	ACTGTGCCATCAGCAAGGTT
	Reverse	GCTCTTTGTCCATTGGGTCTT
CD86	Forward	TCAATGGGACTGCATATCTGCC
	Reverse	GCCAAAATACTACCAGCTCACT
Arg-1	Forward	AGCTCTGGGAATCTGCATGG
	Reverse	ATGTACACGATGTCTTTGGCAGATA
CD163	Forward	GCTACATGGCGGTGGAGACAA
	Reverse	ATGATGAGAGGCAGCAAGATGG

纳米粒肾脏靶向性的探究 取 12 只健康昆明小鼠, 对其左下腹部进行局部脱毛, 随机分为 4 组, 每组 3 只。其中两组分别尾静脉注射 Cy5.5/DXMS/CAP@PLGA-LNHys 及 Cy5.5/DXMS/CAP@PLGA-ILs, 剂量为 0.2 mL/10 g (以 Cy5.5 浓度计); 一组小鼠注射等量生理盐水作为空白对照, 一组小鼠注射等量游离 Cy5.5 荧光染料作为阴性对照组。注射 24 h 后用 IVIS[®] 成像系统对小鼠进行活体成像, 成像记录后解剖分离小鼠脑、心、肝、脾、肺、肾, 再次成像记录, 并对荧光区域进行荧光半定量分析。

系膜增生性肾小球肾炎模型的建立 建立系膜增生性肾小球肾炎 (mesangial proliferative glomerulonephritis, MesPGN) 小鼠模型^[30,31]。具体方法如下: 取健康雄性昆明小鼠, 按 0.5 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 剂量尾静脉注射 HSV, 3 天后, 存活的小鼠按 0.55 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 剂量再次尾静脉注射 HSV。本课题组前期研究中已验证了该方法的造模效果^[19]。

DXMS/CAP@PLGA-ILs 对系膜增生性肾小球肾炎的治疗 将建立的 MesPGN 模型小鼠随机分 7 组 (模型对照组、DXMS/CAP@PLGA-ILs 治疗组、DXMS/CAP@PLGA-LNHys 治疗组、游离 DXMS/CAP 混合组、DXMS 组、CAP 组、空白对照组), 每组 5 只, 通过尾静脉注射给药 (DXMS 给药剂量为 1 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$; CAP 给药剂量为 2 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$), 每次给药间隔 1 天, 共给药 3 次, 正

常组和模型对照组给予等体积生理盐水。给药后第7天,采用眼球摘除法收集小鼠血液并分离血清,将血清置于 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存,采用ELISA试剂盒对血清中肾脏损伤指标肌酐(creatinine, Cre)和尿素氮(blood uric nitrogen, BUN)进行测定。颈椎脱臼法处死各组小鼠后,解剖收集小鼠肾脏,洗净滤干后称重并记录数据,计算其肾脏指数,肾脏指数为肾脏重量占小鼠体重的百分比。取单侧肾脏用4%多聚甲醛固定并切片,苏木精-伊红(hematoxylin-eosin, HE)染色,光学显微镜下观察肾脏形态。取新鲜肾皮质,将一部分样品制备成组织匀浆液,于 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、 $5\ 000\ \text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心5 min取上清,用ELISA试剂盒检测组织匀浆中TNF- α 、IL-6、TGF- β 、IL-10细胞因子的表达;另一部分肾脏样品用液氮研磨成粉,加入细胞裂解液后置于 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存,用RT-PCR方法检测肾脏中iNOS、CD86、Arg-1、CD163的表达。

统计学方法 采用SPSS软件进行统计学分析。计量资料均采用均值 \pm 标准差($\bar{x}\pm s$)表示,组间比较采用单因素方差分析,当 $P < 0.05$ 时被认为具有统计学意义。

结果

1 DXMS/CAP@PLGA-ILs的理化性质

本研究成功制备了具有壳核结构的共载DXMS和CAP的免疫脂质体复合纳米粒(DXMS/CAP@PLGA-ILs)。粒径分布如图1所示,DXMS@PLGA纳米粒的粒径为 $94.28\pm 4.70\ \text{nm}$,PDI为 0.148 ± 0.08 ,zeta

电位为 $-23.9\pm 1.14\ \text{mV}$;DXMS/CAP@PLGA-LNHys粒径为 $112.8\pm 1.12\ \text{nm}$,PDI为 0.202 ± 0.004 ,zeta电位为 $-19.4\pm 0.96\ \text{mV}$,纳米粒粒径的增加说明脂质膜材成功包覆在DXMS@PLGA纳米粒的表面。修饰上integrin $\alpha 8$ 抗体后,DXMS/CAP@PLGA-ILs的粒径为 $115.9\pm 2.89\ \text{nm}$,PDI为 0.178 ± 0.07 ,zeta电位为 $-12.3\pm 1.94\ \text{mV}$ 。透射电镜结果证实了制备的DXMS/CAP@PLGA-ILs纳米粒呈圆球状核壳结构(图2),表明成功制备了脂质体包被的纳米粒。经测定,DXMS/CAP@PLGA-ILs对DXMS和CAP的载药量分别为 $5.72\%\pm 0.37\%$ 和 $7.51\%\pm 0.07\%$ 。

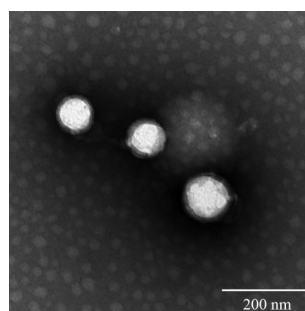


Figure 2 Transmission electron microscopic images of DXMS/CAP@PLGA-ILs. Scale bar: 200 nm

2 DXMS/CAP@PLGA-ILs的体外释放特性

如图3所示,游离的DXMS在前4 h平均释放量可达到68.46%,在24 h以内累计释放达到100%;游离的CAP前4 h平均释放量可达到97.64%。而DXMS/CAP@PLGA-ILs中DXMS和CAP前4 h平均累计释

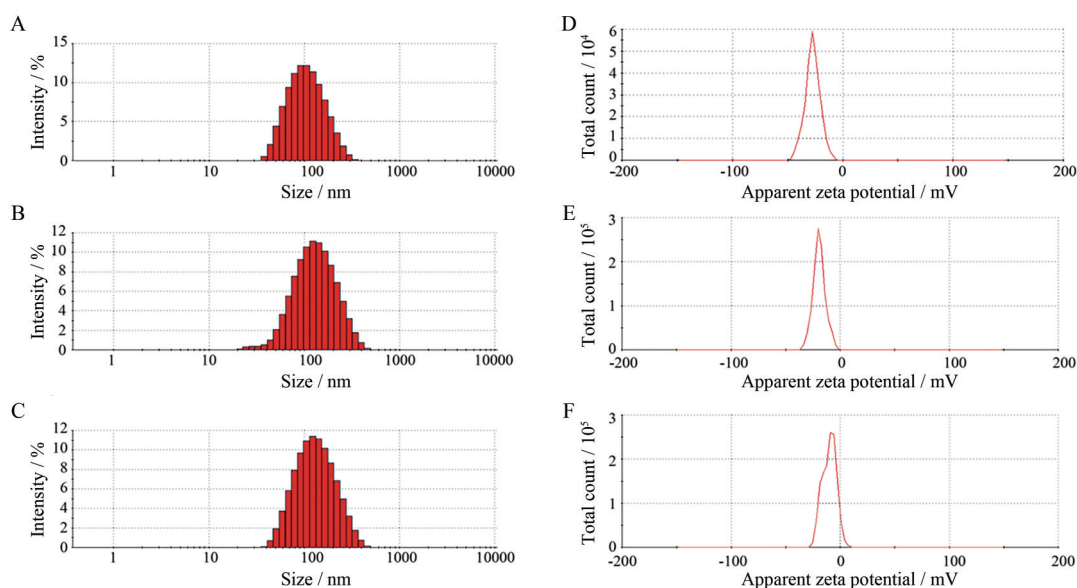


Figure 1 A-C: Size distribution of DXMS@PLGA (A), DXMS/CAP@PLGA-LNHys (B) and DXMS/CAP@PLGA-ILs (C); D-F: Zeta potential of DXMS@PLGA (D), DXMS/CAP@PLGA-LNHys (E) and DXMS/CAP@PLGA-ILs (F). DXMS: Dexamethasone; PLGA: Poly(lactic-co-glycolic acid); CAP: Captopril; LNHys: Liposome-nanoparticle hybrids; ILs: Immunoliposomes

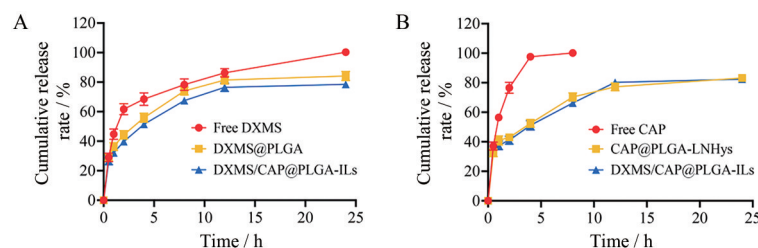


Figure 3 *In vitro* cumulative release of DXMS (A) and CAP (B), $n = 3, \bar{x} \pm s$

放量分别为51.45%和51.06%, 24 h平均累计释放量分别为78.55%和82.44%。以上结果表明, 与游离的DXMS和CAP相比, 药物被包载到脂质体复合纳米粒中, 突释效应明显降低, 并呈现良好的缓释特征。此外, 由于DXMS/CAP@PLGA-ILs是脂质体包裹纳米粒形成的壳核结构, DXMS的释放需再穿过脂质体膜, 因此DXMS在DXMS/CAP@PLGA-ILs中的释放较DXMS@PLGA中稍慢(图3A), 而CAP处于脂质体空囊中, 仅需穿过脂质体膜即可释放, 因此CAP在DXMS/CAP@PLGA-ILs中的释放与CAP@PLGA-LNHys中的释放一致(图3B), 这也进一步验证了纳米粒壳核结构的完整性。

3 DXMS/CAP@PLGA-ILs可调控体外巨噬细胞的分化

首先, 使用CCK-8法测定纳米载体及药物对巨噬细胞的毒性(图4)。PLGA-LNHys载体组和PLGA-ILs载体组对细胞活力没有明显影响, DXMS/CAP组的细胞存活率在86.3%以上(图4A), 可认为材料和游离药物对巨噬细胞基本无细胞毒性。双载药纳米粒(DXMS/CAP@PLGA-ILs)中DXMS质量浓度在 $2.5 \sim 40 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 对RAW264.7细胞无明显毒性(图4B)。

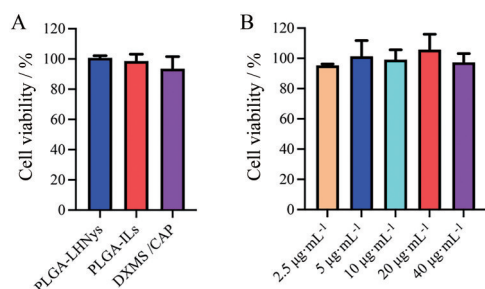


Figure 4 *In vitro* cytotoxicity of nanoparticles. A: Cytotoxicity of PLGA-LNHys (PLGA: $1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$), PLGA-ILs (PLGA: $1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$) and DXMS/CAP (DXMS: $40 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, CAP: $80 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$); B: Cytotoxicity of DXMS/CAP@PLGA-ILs at different concentrations of DXMS (2.5 to $40 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)

接下来, 检测致炎细胞因子TNF- α 、IL-6、TGF- β 和IL-10的含量(图5A~D)。与空白对照相比, 模型组中M1型巨噬细胞特异性细胞因子TNF- α 和IL-6的表达

降低, 而M2型巨噬细胞特异性TGF- β 和IL-10的表达升高, 证明造模成功。相比于模型组, 经共给药治疗后, 细胞分泌的IL-6和TNF- α 的含量显著升高, 而IL-10和TGF- β 的含量显著降低($P < 0.001$)。以上结果表明DXMS和CAP双药治疗可有效调控巨噬细胞的分化, 促使已分化的M2型巨噬细胞往未分化的普通巨噬细胞转移。此外, 药物包裹入纳米粒中与游离药物相比, 对巨噬细胞分化的影响没有明显的区别, 可能是由于肾靶向性纳米粒在体外细胞实验中难以体现出靶向性优势。

为进一步验证共载药纳米粒对巨噬细胞分化的影响, 采用RT-PCR法检测了巨噬细胞中M1型特异性标志物iNOS和CD86的相对表达量, 以及M2型特异性标志物Arg-1和CD163的相对表达量。结果如图5E~H所示, 相比于空白组, 模型组细胞的iNOS和CD86的相对表达量均显著降低($P < 0.001$), 而Arg-1和CD163的相对表达量均显著升高($P < 0.001$), 表明造模成功。与图5A~D呈现的结果趋势相同, 在给药处理后, 相比于模型组, 各给药治疗组都可显著提升iNOS和CD86的相对表达量, 同时显著降低Arg-1和CD163的表达量($P < 0.001$)。另外, 双给药组比单药组对巨噬细胞分化的影响更为明显, 说明DXMS和CAP合用具有协同作用。以上结果表明, DXMS和CAP的联合治疗可使M2型巨噬细胞分化减少, 具有潜在的抗纤维化效果。

4 DXMS/CAP@PLGA-ILs具有良好的肾靶向性

为考察纳米粒的体内肾靶向性, 采用活体成像仪对载荧光素的双载药纳米粒的体内分布进行分析。结果如图6所示, 给药24 h时, 含有靶向抗体修饰的Cy5.5/DXMS/CAP@PLGA-ILs组在肾脏中的荧光强度显著高于Cy5.5/DXMS/CAP@PLGA-LNHys组。活体成像结果与离体成像结果一致, 并与前期验证的纳米载体的体内分布结果趋势相同^[8], 表明DXMS/CAP@PLGA-ILs纳米粒具有良好的肾脏靶向性并可较长时间积蓄在肾脏中。

5 DXMS/CAP@PLGA-ILs能有效控制肾小球肾炎

为考察DXMS/CAP@PLGA-ILs纳米粒对小鼠肾

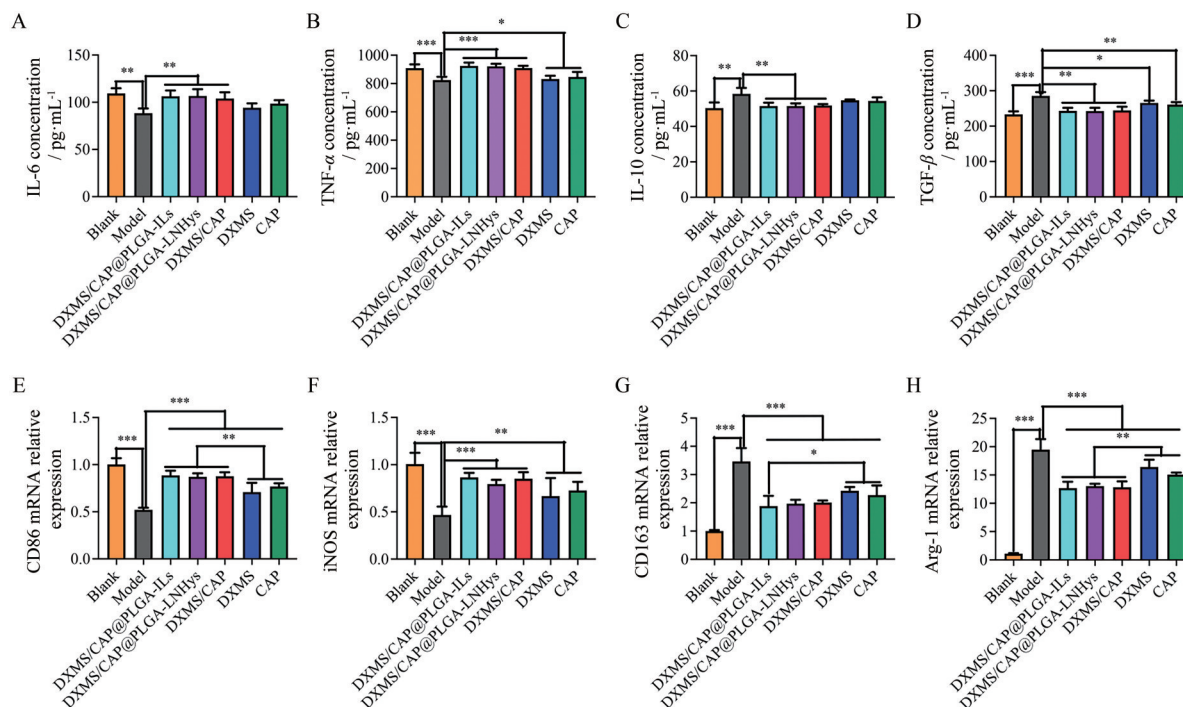


Figure 5 Effects of dual drug-loaded nanoparticles on the cytokine secretion by macrophages and on the mRNA expression of macrophages. A: Interleukin-6 (IL-6); B: Tumor necrosis factor- α (TNF- α); C: Interleukin-10 (IL-10); D: Transforming growth factor- β (TGF- β); E: CD86; F: iNOS; G: CD163; H: Arg-1. $n = 3, \bar{x} \pm s$. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$

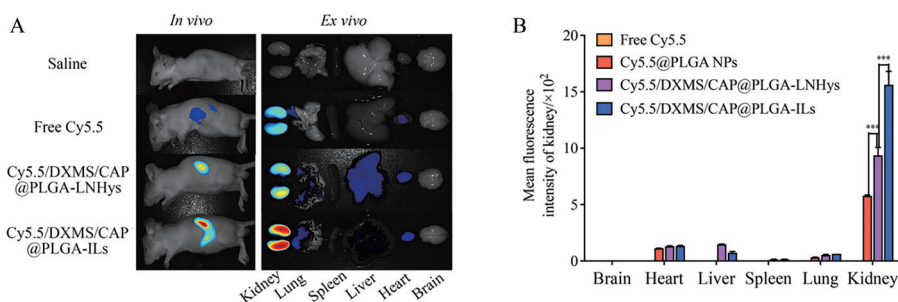


Figure 6 *In vivo* distribution of nanoparticles. A: *In vivo* imaging of mice and *ex vivo* imaging of organs 24 h after administration; B: Mean fluorescence intensity of kidney in mice. $n = 3, \bar{x} \pm s$. *** $P < 0.001$

小球肾炎的治疗作用,建立了MesPGN小鼠模型,测定了小鼠肾指数、血清生化指标及肾组织学形态。如图7所示,DXMS/CAP@PLGA-ILs可明显改善模型组小鼠肾脏因缺血呈现的砖黄色外观,使肾脏恢复了一定的红润和光泽(图7A),并可显著降低小鼠肾脏指数(图7B),说明经治疗后肾脏的外观和大小恢复正常。相比于模型组,经药物治疗后小鼠血清中Cre和BUN浓度显著降低,且DXMS/CAP@PLGA-ILs组基本恢复到空白组浓度水平(图7C、D)。此外,模型组小鼠肾脏切片可见肾小球内纤维素样坏死(图7E),肾小球系膜区域基质增加且系膜细胞明显增生,而DXMS/CAP@PLGA-ILs组无明显的肾小球系膜增生和纤维素样坏死。由此可见,DXMS/CAP@PLGA-ILs对

MesPGN模型小鼠的肾脏功能具有很强的修复作用。**6 DXMS/CAP@PLGA-ILs能调控肾小球肾炎小鼠中巨噬细胞极化**

肾脏中炎症因子的分泌可用于判断CGN的严重程度,因此对肾脏组织匀浆液中炎症细胞因子TNF- α 、IL-6、TGF- β 和IL-10进行测定,以进一步验证共递药免疫脂质体复合纳米粒对CGN的治疗效果。结果如图8A~D所示,模型对照组中各种细胞因子表达量都明显升高($P < 0.001$),表明造模成功。相比于模型组,经CAP和/或DXMS治疗后4种炎症因子都显著降低,其中DXMS/CAP@PLGA-ILs纳米粒对IL-6和TGF- β 的控制效果最好,明显优于游离DXMS/CAP组和不含靶向抗体的DXMS/CAP@PLGA-LNHys纳米粒组。

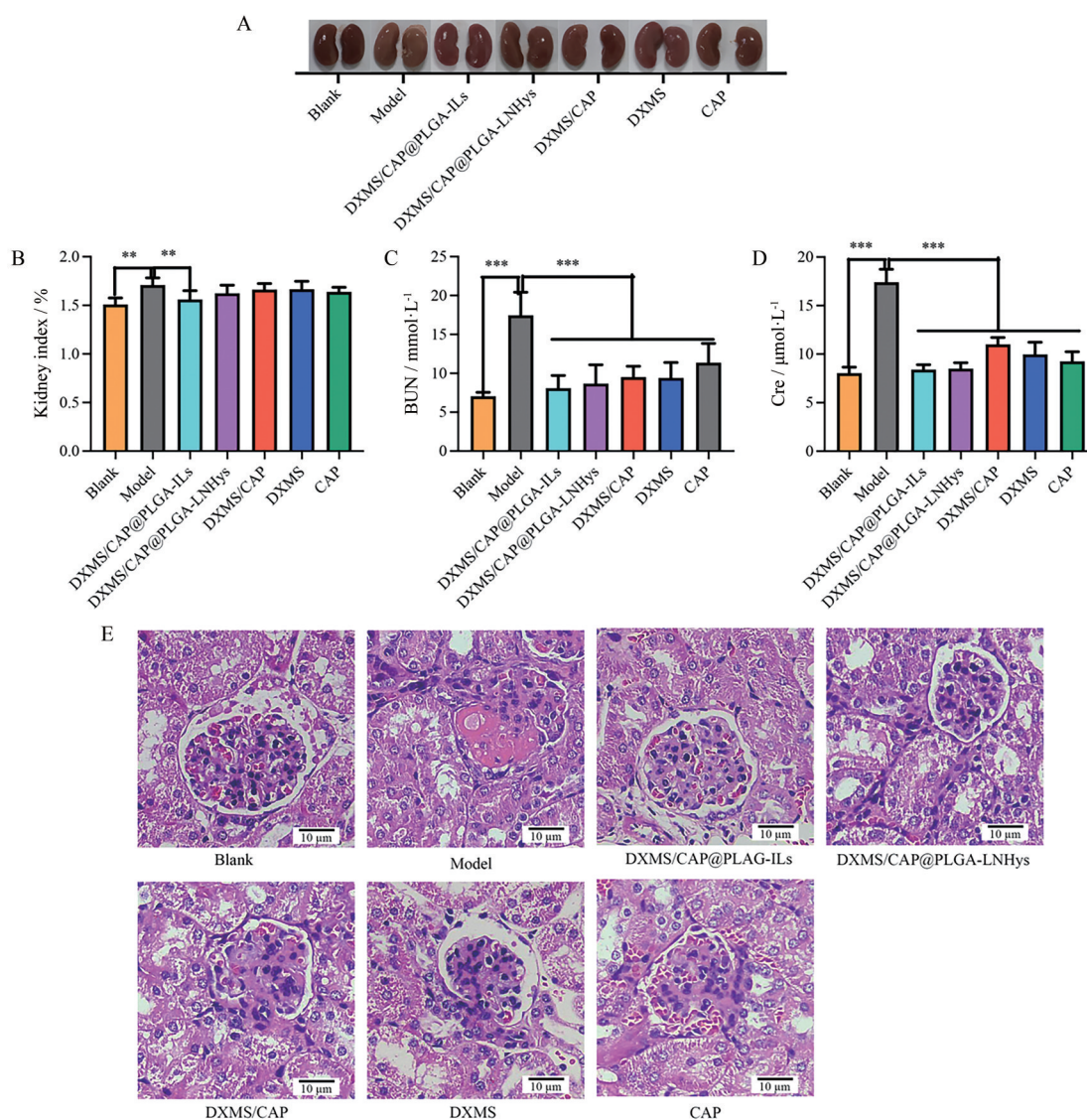


Figure 7 Therapeutic effects of dual drug-loaded nanoparticles on glomerulonephritis in mice. A: Kidney appearance; B: Renal index (kidney weight to body weight ratio); C: Serum blood uric nitrogen (BUN) concentration; D: Serum creatinine (Cre) concentration. E: Hematoxylin-eosin (HE) stained histology section of kidney. Scale bar: 10 μm, $n = 5$, $\bar{x} \pm s$. ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$

以上结果表明, integrin $\alpha 8$ 抗体修饰的纳米粒能更高效地将药物递送至病灶, 发挥强烈的抗炎作用以有效控制CGN小鼠肾脏中的炎症因子水平。由于TGF- $\beta 1$ 是肾纤维化的一种重要介质, 可诱导肾脏瘢痕形成^[32,33], 因此制备的肾靶向共递药纳米粒也具有潜在的抗纤维化作用。此外, 由于IL-6和TNF- α 主要是M1型巨噬细胞分泌的细胞因子, 而IL-10和TGF- β 主要是M2型巨噬细胞分泌的细胞因子, 此结果还间接表明DXMS/CAP@PLGA-ILs纳米粒可调控肾脏中的巨噬细胞分化, 使分泌炎症因子的M1型巨噬细胞和M2型巨噬细胞的相对量都减少。

接下来通过RT-PCR实验研究肾脏中巨噬细胞标记物的mRNA相对表达量的变化, 从而进一步评估纳

米粒对肾脏中巨噬细胞分化的影响。结果如图8E~H所示, 与空白对照组相比, 模型组小鼠肾脏中M1型巨噬细胞标记物iNOS、CD86及M2型巨噬细胞标记物Arg-1、CD163的相对表达量都显著升高($P < 0.001$), 说明模型小鼠肾脏中同时存在大量的M1型和M2型巨噬细胞, 结合图8A~D中炎症细胞因子的分泌可看出模型小鼠肾炎严重且有极强的纤维化倾向。与模型组相比, 各给药治疗组iNOS、CD86、Arg-1和CD163的相对表达量均显著下降。与图8A~D中炎症细胞因子分泌的趋势相同, 相比于游离DXMS/CAP组和不含靶向抗体的DXMS/CAP@PLGA-LNHys组, DXMS/CAP@PLGA-ILs纳米粒依靠其优越的肾靶向能力及药物的强抗炎能力, 能将模型小鼠肾脏中的4种巨噬

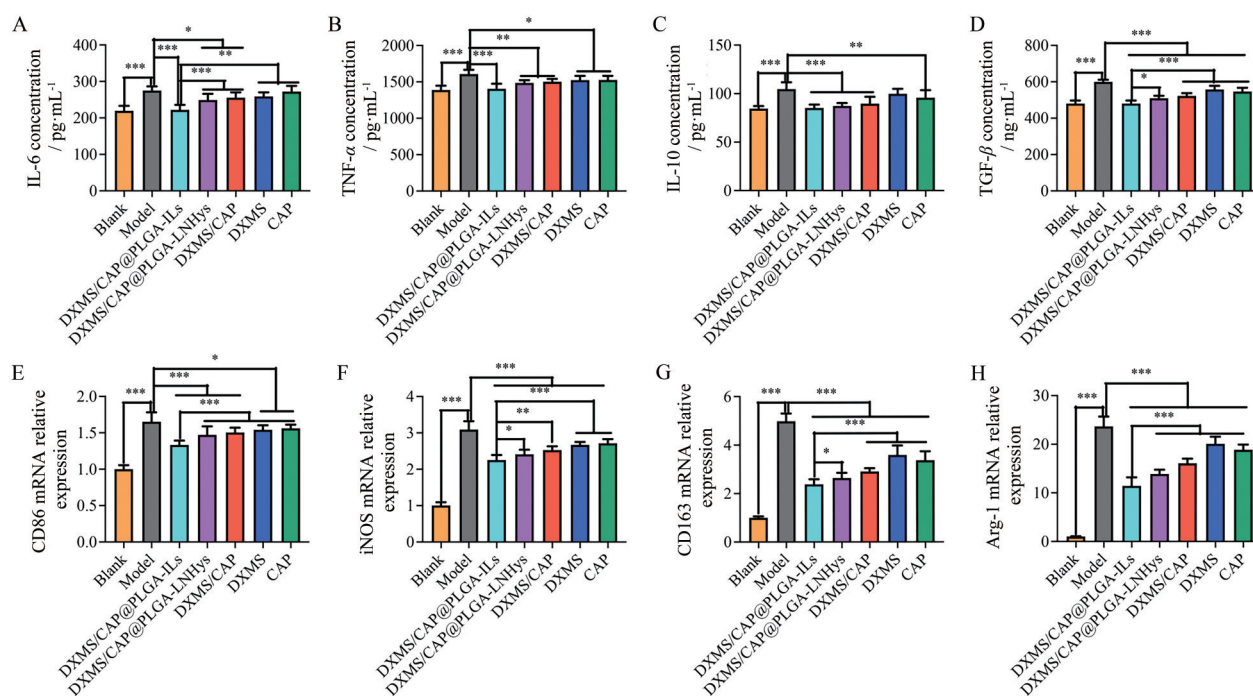


Figure 8 Effects of dual drug-loaded nanoparticles on the secretion of inflammatory cytokines and on the mRNA expression of macrophage markers in the kidney in mice. A: IL-6; B: TNF- α ; C: IL-10; D: TGF- β ; E: CD86; F: iNOS; G: CD163; H: Arg-1. $n = 5$, $\bar{x} \pm s$. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$

细胞标记物的 mRNA 水平降到最低 (图 8E~H), 说明 DXMS/CAP@PLGA-ILs 纳米粒可同时减少肾脏中 M1 型和 M2 型巨噬细胞的含量, 起到抗炎和抗纤维化的双重效果。

讨论

核壳型脂质体聚合纳米粒是由纳米粒内核和脂质体磷脂双分子层组成的, 因此该纳米粒具备了纳米粒和脂质体的双重优点, 具有多元化载药、结构稳定、粒径分布均匀等特点^[34]。本研究所制备的 PLGA 纳米粒随着脂质体层的装配及抗体的修饰, 粒径从 94 nm 逐渐上升到 116 nm, zeta 电位的绝对值逐渐降低, 透射电镜图中呈现出明显的壳核结构, 且包裹脂质体的纳米粒对 DXMS 的体外释放具有更强的阻滞作用, 表明制备的脂质体复合纳米粒的结构符合预期。

有研究指出, 针对 MCs 的给药系统需具备大小合适的粒径, 粒径范围在 70~130 nm 的纳米粒能顺利透过肾小球内皮间隙 (70~130 nm) 进入肾小球 MCs 区域, 而不能进一步穿过肾小球基底膜 (10~70 nm), 从而被动靶向至 MCs 区域, 而大于 130 nm 的纳米粒会更多地积聚到肝脾中^[20,21,26,35]。前期研究发现, 空白纳米载体最初在肝脏大量分布, 随后逐渐蓄积于肾^[18], 本研究中的共载药纳米粒也能在给药 24 h 富集于肾脏, 说明粒径适宜的共载药纳米粒具有良好的肾靶向性。此

外, 本研究在共载药纳米粒表面进行 PEG 修饰和 integrin $\alpha 8$ 抗体修饰, PEG 修饰可使纳米粒在体内循环的时间延长^[36,37], 而 integrin $\alpha 8$ 抗体能特异性靶向 MCs 细胞表面的特定抗原, 使纳米粒具有更强的肾靶向性和肾滞留能力^[38]。

在 CGN 病理过程中, 炎症反应与纤维化反应往往同时存在, 因此体内 M1 型巨噬细胞和 M2 型巨噬细胞也同时存在^[39,40]。为实现抗炎抗纤维化的双重作用, 将难溶于水的 DXMS 包裹于 PLGA 内核中, 将水溶性 CAP 装载于脂质体空腔中。与 T 细胞相似, 巨噬细胞可极化成一种特定亚型, 具有完全相反的功能, 从促炎到抗炎或促纤维化, 巨噬细胞的亚型可通过标记物的研究和细胞因子的表达来表征。研究报道细胞因子 TNF- α 、IL-6 与标记物 iNOS、CD86 可用来表征 M1 型巨噬细胞^[41,42], 而细胞因子 TGF- β 、IL-10 和标记物 Arg-1、CD163 则用来表征 M2 型巨噬细胞^[29,43]。为了验证 DXMS/CAP@PLGA-ILs 纳米粒对巨噬细胞分化的影响, 本研究选择 RAW264.7 细胞进行体外研究。结果表明, 所有的双药给药组均能有效调控造模后的巨噬细胞, 使其分泌的极化相关细胞因子含量及细胞内标记物的 mRNA 表达量接近空白对照组的水平, 且与模型组有显著性差异。由此可见, 在体外细胞实验中 DXMS/CAP@PLGA-ILs 纳米粒能有效发挥 DXMS 和 CAP 的抗炎与抗纤维化的能力, 使已分化的 M2 型巨

噬细胞往正常未分化的巨噬细胞方向转移。

HSV 诱导的急性 MesPGN 模型可产生与 CGN 相似的病理表现, 通过尾静脉注射 HSV 可引起肾小球系膜区域病变, 包括系膜溶解、MC 凋亡和细胞外基质积累等^[44]。因此, 本研究采用 HSV 诱导建立 MesPGN 模型。大量研究指出, 在各类促炎细胞因子中, TNF- α 、IL-6 是肾损伤后炎症的关键介质。本研究结果显示 DXMS/CAP@PLGA-ILs 可抑制 MesPGN 鼠肾脏中炎症因子 TNF- α 、IL-6 及纤维化因子 TGF- β 的表达, 证实了共载药纳米粒的强大抗炎能力。此外, 肾脏中巨噬细胞特异性标记物的 mRNA 水平检测结果与体外细胞实验及肾脏中炎症因子分泌结果的趋势基本一致。DXMS/CAP@PLGA-ILs 纳米粒由于其强烈的肾靶向性而显示出最佳的控制肾炎及调控巨噬细胞分化的能力。结合体内外实验结果, 推测 DXMS/CAP@PLGA-ILs 纳米粒可大量蓄积于肾脏 MCs, 释放出 DXMS 和 CAP 以发挥药物的直接抗炎作用, 并作用于肾脏中的巨噬细胞, 控制巨噬细胞的分化, 避免其往 M2 型巨噬细胞方向分化, 同时对已分化为 M2 型的巨噬细胞也可将其逆转为未分化的巨噬细胞, 伴随着炎症的控制, 肾脏中 M1 型巨噬细胞也减少, 从而达到抗炎抗纤维化的双重作用。然而, 本研究未能证明肾脏中的炎症细胞因子是由相应巨噬细胞所分泌, 也未直接测定肾脏中 M1 型和 M2 型巨噬细胞的数量变化 (如流式细胞仪、免疫荧光染色、免疫组化等), 也未考察 DXMS/CAP@PLGA-ILs 纳米粒对 MesPGN 小鼠长期炎症和纤维化的控制效果, 本课题组后期还将继续深入研究纳米粒抗炎抗纤维化的作用机制。

总之, 本研究成功制备了壳核结构的 DXMS/CAP@PLGA-ILs 纳米粒, 证明了该纳米粒的强肾脏靶向能力, 通过体内外实验初步探索了 DXMS/CAP@PLGA-ILs 纳米粒对巨噬细胞极化的影响, 证明了纳米粒的抗炎和抗纤维化能力。本研究为 CGN 的治疗提供了新思路, 也为后续深入探索巨噬细胞参与 CGN 的调控机制研究提供了科学依据。

作者贡献: 李贤哲负责实验操作、数据整理及论文撰写; 周柳廷、刘红梅和赵越参与部分实验操作及数据分析; 何黎黎负责文章修改; 袁志翔和刘天庆负责提出研究思路; 韩露负责设计实验方案、撰写及修改论文。

利益冲突: 所有作者声明不存在任何利益冲突。

References

[1] Lousa I, Reis F, Beirao I, et al. New potential biomarkers for chronic kidney disease management – a review of the literature [J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22: 43.

[2] Xie J, Chen N. Primary glomerulonephritis in mainland China: an overview [J]. *Contrib Nephrol*, 2013, 181: 1-11.

[3] Tumlin JA, Madaio MP, Hennigar R. Idiopathic IgA nephropathy: pathogenesis, histopathology, and therapeutic options [J]. *Clin J Am Soc Nephrol*, 2007, 2: 1054-1061.

[4] Zhao JH. Mesangial cells and renal fibrosis [J]. *Adv Exp Med Biol*, 2019, 1165: 165-194.

[5] Liu CP, Hu Y, Lin JC, et al. Targeting strategies for drug delivery to the kidney: from renal glomeruli to tubules [J]. *Med Res Rev*, 2019, 39: 561-578.

[6] Klahr S, Morrissey JJ. The role of vasoactive compounds, growth factors and cytokines in the progression of renal disease [J]. *Kidney Int Suppl*, 2000, 75: S7-S14.

[7] Gordon S, Mann APD. Tissue macrophages: heterogeneity and functions [J]. *BMC Biol*, 2017, 15: 53.

[8] Zhao FZ, Sang XQ, Zhu Y, et al. Effect and mechanism of IL-6 induced by M2 macrophages on the lung fibroblasts activation [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2020, 55: 892-897.

[9] Ley K. M1 means kill; M2 means heal [J]. *J Immunol*, 2017, 199: 2191-2193.

[10] Kushiya T, Oda T, Yamada M, et al. Alteration in the phenotype of macrophages in the repair of renal interstitial fibrosis in mice [J]. *Nephrology*, 2011, 16: 522-535.

[11] Ruiz-Ortega M, Rayego-Mateos S, Lamas S, et al. Targeting the progression of chronic kidney disease [J]. *Nat Rev Nephrol*, 2020, 16: 269-288.

[12] Ayroldi E, Cannarile L, Migliorati G, et al. Mechanisms of the anti-inflammatory effects of glucocorticoids: genomic and non-genomic interference with MAPK signaling pathways [J]. *FASEB J*, 2012, 26: 4805-4820.

[13] Rhen T, Cidlowski JA. Antiinflammatory action of glucocorticoids – new mechanisms for old drugs [J]. *N Engl J Med*, 2005, 353: 1711-1723.

[14] Clark AR, Martins JRS, Tchen CR. Role of dual specificity phosphatases in biological responses to glucocorticoids [J]. *J Biol Chem*, 2008, 283: 25765-25769.

[15] Corey SJ, Jha J, Mccart EA, et al. Captopril mitigates splenomegaly and myelofibrosis in the *Gattallow* murine model of myelofibrosis [J]. *J Cell Mol Med*, 2018, 22: 4274-4282.

[16] Eddy, Allison A. Progression in chronic kidney disease [J]. *Adv Chronic Kidney Dis*, 2005, 12: 353-365.

[17] Shirazi M, Noorafshan A, Bahri MA, et al. Captopril reduces interstitial renal fibrosis and preserves more normal renal tubules in neonatal dogs with partial urethral obstruction: a preliminary study [J]. *Urol Int*, 2007, 78: 173-177.

[18] Zhou LT, Ye Z, Zhang E, et al. Co-delivery of dexamethasone and captopril by $\alpha 8$ integrin antibodies modified liposome-PLGA nanoparticle hybrids for targeted anti-inflammatory/anti-fibrosis therapy of glomerulonephritis [J]. *Int J Nanomed*, 2022, 17: 1531-1547.

- [19] Fang PC, Han L, Liu C, et al. Dual-regulated functionalized liposome-nanoparticle hybrids loaded with dexamethasone/TGF β 1-siRNA for targeted therapy of glomerulonephritis [J]. ACS Appl Mater Interfaces, 2022, 14: 307-323.
- [20] Choi CHJ, Zuckerman JE, Webster P, et al. Targeting kidney mesangium by nanoparticles of defined size [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2011, 108: 6656-6661.
- [21] Guo L, Luo S, Du ZW, et al. Targeted delivery of celestrol to mesangial cells is effective against mesangioproliferative glomerulonephritis [J]. Nat Commun, 2017, 8: 878.
- [22] Zhang MY, He JH, Zhang WL, et al. Fabrication of TPGS-stabilized liposome-PLGA hybrid nanoparticle *via* a new modified nanoprecipitation approach: *in vitro* and *in vivo* evaluation [J]. Pharm Res, 2018, 35: 1-13.
- [23] Shin GH, Chung SK, Kim JT, et al. Preparation of chitosan-coated nanoliposomes for improving the mucoadhesive property of curcumin using the ethanol injection method [J]. J Agric Food Chem, 2013, 61: 11119-11126.
- [24] Zhao YN, Gan L, Wang J, et al. *In vitro* study on gene transfection efficiency of hyaluronic acid modified core-shell liponanoparticles in human retinal pigment epithelium cells [J]. Acta Pharm Sin (药学报), 2014, 49: 711-717.
- [25] Iden DL, Allen TM. *In vitro* and *in vivo* comparison of immunoliposomes made by conventional coupling techniques with those made by a new post-insertion approach [J]. Biochim Biophys Acta, 2001, 1513: 207-216.
- [26] Scindia Y, Deshmukh U, Thimmalapura PR, et al. Anti-alpha8 integrin immunoliposomes in glomeruli of lupus-susceptible mice: a novel system for delivery of therapeutic agents to the renal glomerulus in systemic lupus erythematosus [J]. Arthritis Rheum, 2008, 58: 3884-3891.
- [27] Meng FX. The Selective Killing Effects of *HSV-tk* Gene Mediated by GP73 Antibody Modified Cationic Liposome on Hepatocellular Carcinoma Cells (GP73 抗体修饰阳离子脂质体介导 *HSV-tk* 基因对肝癌细胞的选择性杀伤作用研究) [D]. Taiyuan: Shanxi Medical University, 2017.
- [28] Steen EH, Wang XY, Balaji S, et al. The role of the anti-inflammatory cytokine interleukin-10 in tissue fibrosis [J]. Adv Wound Care, 2020, 9: 184-198.
- [29] Wang LX, Zhang SX, Wu HJ, et al. M2b macrophage polarization and its roles in diseases [J]. J Leukoc Biol, 2019, 106: 345-358.
- [30] Neto OMV, Russo EM, Costa RS, et al. Effect of the absence of interleukin-12 on mesangial proliferative glomerulonephritis induced by habu snake venom [J]. Ren Fail, 2009, 31: 964-970.
- [31] Wu LL, Chen XN, Mei Y, et al. CXCL10 expression induced by Mx1 inactivation induces mesangial cell apoptosis in mouse habu nephritis [J]. Cell Signal, 2015, 27: 943-950.
- [32] Tang MK, Nikolic-Paterson DJ, Lan HY. Macrophages: versatile players in renal inflammation and fibrosis [J]. Nat Rev Nephrol, 2019, 15: 144-158.
- [33] Yang Y, Feng X, Liu X, et al. Fate alteration of bone marrow-derived macrophages ameliorates kidney fibrosis in murine model of unilateral ureteral obstruction [J]. Nephrol Dial Transplant, 2019, 34: 1657-1668.
- [34] Xue JX, Bi HS, Li YA, et al. Preparation and *in vitro* performance evaluation of doxorubicin loaded lipid calcium phosphate nanoparticles with shell-core structure [J]. Acta Pharm Sin (药学报), 2018, 53: 1365-1371.
- [35] Fleischmann D, Harloff M, Figueroa SM, et al. Targeted delivery of soluble guanylate cyclase (sGC) activator cinaciguat to renal mesangial cells *via* virus-mimetic nanoparticles potentiates anti-fibrotic effects by cGMP-Mediated suppression of the TGF- β pathway [J]. Int J Mol Sci, 2021, 22: 2557.
- [36] Patsula V, Horák D, Kučka J, et al. Synthesis and modification of uniform PEG-neridronate-modified magnetic nanoparticles determines prolonged blood circulation and biodistribution in a mouse preclinical model [J]. Sci Rep, 2019, 9: 10765.
- [37] Zhou H, Fan Z, Li PY, et al. Dense and dynamic polyethylene glycol shells cloak nanoparticles from uptake by liver endothelial cells for long blood circulation [J]. ACS Nano, 2018, 12: 10130-10141.
- [38] Kim J, Kim J, Jeong C, et al. Synergistic nanomedicine by combined gene and photothermal therapy [J]. Adv Drug Deliv Rev, 2016, 98: 99-112.
- [39] Engel JE, Chade AR. Macrophage polarization in chronic kidney disease: a balancing act between renal recovery and decline? [J]. Am J Physiol Renal Physiol, 2019, 317: F1409-F1413.
- [40] Ardura JA, Rackov G, Izquierdo E, et al. Targeting macrophages: friends or foes in disease? [J]. Front Pharmacol, 2019, 10: 1255.
- [41] Liang X, Luo M, Shao B, et al. Phosphatidylserine released from apoptotic cells in tumor induces M2-like macrophage polarization through the PSR-STAT3-JMJD3 axis [J]. Cancer Commun (Lond), 2022, 42: 205-222.
- [42] Tian L, Li W, Yang L, et al. Cannabinoid receptor 1 participates in liver inflammation by promoting M1 macrophage polarization *via* RhoA/NF- κ B p65 and ERK1/2 pathways, respectively, in mouse liver fibrogenesis [J]. Front Immunol, 2017, 8: 1214.
- [43] Chinetti-Gbaguidi G, Colin S, Staels B. Macrophage subsets in atherosclerosis [J]. Nat Rev Cardiol, 2015, 12: 10-17.
- [44] Cattell V, Bradfield JWB. Focal mesangial proliferative glomerulonephritis in the rat caused by habu snake venom. A morphologic study [J]. Am J Pathol, 1977, 87: 511-524.