

载葛根素血浆外泌体的制备及其对体外血脑屏障模型通透性的影响

张 奇^{1,2}, 郝路格^{1,2}, 张 鑫^{1,2}, 张胜霄^{1,2}, 张健东^{1,2}, 赵振奥³, 李 炜^{1,2*}

(1. 河北北方学院药学院, 河北 张家口 075000; 2. 河北省神经药理学重点实验室, 河北 张家口 075000;
3. 河北北方学院微循环研究所, 河北 张家口 075000)

摘要: 通过超速离心法提取大鼠血浆外泌体 (plasma exosomes, Pla-Exos), 150 000 ×g, 离心 2.5 h。比较超速离心法、超滤法、磁珠捕获法对 Pla-Exos 的纯化效果。使用超声共孵育的方法制备载葛根素外泌体 (plasma exosomes carrying puerarin, Pue-Exos), 以包封率为指标采用响应面法筛选最优处方并测定表征、评估稳定性和体外释放情况。纯化的 Pla-Exos 和 Pue-Exos 的粒径均在 30~150 nm 内; 蛋白质免疫印迹法结果显示, 纯化的 Pla-Exos 和 Pue-Exos 均含有标志蛋白 TSG101、CD63、CD81。透射电镜观察纯化后的 Pla-Exos 和 Pue-Exos 均具有良好的双层膜囊泡结构。Pue-Exos 制备的最优处方为孵育 1 h, 超声功率 39 W, 载药比 10:1。制备得到的 Pue-Exos 有较好的稳定性和缓释作用, 提高了葛根素体外血脑屏障的透过效率 ($P < 0.01$)。本研究经河北北方学院实验动物伦理审查委员会批准, 伦理审批号: HBNV202307012103。

关键词: 葛根素; 血浆外泌体; 超速离心法; 磁珠捕获法; 血脑屏障

中图分类号: R943 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2025)05-1534-09

Investigation of preparation process of puerarin-carrying plasma exosomes and effect on permeability in an *in vitro* blood-brain barrier model

ZHANG Qi^{1,2}, HAO Lu-ge^{1,2}, ZHANG Xin^{1,2}, ZHANG Sheng-xiao^{1,2}, ZHANG Jian-dong^{1,2},
ZHAO Zhen-ao³, LI Wei^{1,2*}

(1. Department of Pharmacy, Hebei North University, Zhangjiakou 075000, China; 2. Hebei Key Laboratory of Neuropharmacology, Zhangjiakou 075000, China; 3. Institute of Microcirculation, Hebei North University, Zhangjiakou 075000, China)

Abstract: Plasma exosomes (Pla-Exos) were extracted from rats by ultracentrifugation. The ultracentrifugation method extracted rat Pla-Exos at a speed of 150 000 ×g for 2.5 h. Various purification methods including ultracentrifugation, magnetic bead capture method, and ultrafiltration would be employed to purify Pla-Exos. The Pue-Exos were prepared *via* sonication-assisted and co-incubation methods. The influence factors and levels of the preparation of plasma exosomes carrying puerarin (Pue-Exos) were investigated by RSM plus CCD method with encapsulation rate as an index. Then the characterization, the stability, and *in vitro* release of Pue-Exos were determined. The particle sizes of exosomes purified by ultracentrifugation, ultrafiltration, or magnetic bead capture method were all within the range of 30–150 nm. The Western blot results showed that purified Pla-Exos and Pue-Exos contained marker proteins TSG101, CD63, and CD81. The TEM showed that purified Pla-Exos and Pue-Exos exhibited well-defined double-layered membrane vesicle structures. The optimal prescription conditions for preparing

收稿日期: 2024-05-27; 修回日期: 2024-07-14.

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (82370508); 河北省自然科学基金资助项目 (H2020405298).

*通讯作者 Tel: 13931315091, E-mail: leewei318@163.com

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2024-0516

Pue-Exos were finally determined as follows: 1 h ultrasound time, 39 W ultrasound power, mass ratio of 10:1. The prepared Pue-Exos exhibit good stability and sustained release, significantly enhancing the *in vitro* transpermeability of puerarin across the blood-brain barrier ($P < 0.01$). This study was approved by the Experimental Animal Ethics Review Committee of Hebei North University, and ethics approval number was HBNV202307012103.

Key words: puerarin; plasma exosome; ultracentrifugation; magnetic bead capture method; blood-brain barrier

葛根素是葛根根部中最丰富的次级代谢产物^[1], 研究表明葛根素可通过清除自由基、激活 AMPK/PGC1 α /Nrf2 信号通路增强抗氧化能力, 通过调节线粒体自噬和抑制 NLRP3/Caspase-1/GSDMD 通路保护神经细胞, 对多种生物学途径产生影响^[2]。但葛根素也同时存在类似其他中药有效成分的水溶性较差、生物利用度低、难透过血脑屏障 (blood-brain barrier, BBB) 等问题。近年来, 研究人员关注到葛根素虽然含有极性的羟基, 但较大的分子量和结构特点限制了其水中的溶解性。一些研究通过化学结构优化、载体包载等方式可改善葛根素的理化性质和生物利用度, 为载葛根素新剂型的研发提供了思路。

外泌体作为自然存在的纳米级囊泡能够有效地穿透各种生物屏障, 具有稳定、特异、灵敏、运输高效等特点^[3]。外泌体广泛分布于人体的多种体液中, 由各类细胞分泌, 并在体内发挥着重要的生物学功能^[4]。在血液中, 血浆外泌体 (plasma exosomes, Pla-Exos) 的含量十分丰富, 它们携带着大量的蛋白质和遗传信息。血浆外泌体透过血脑屏障的机制包括受体介导的跨细胞运输、胞吞作用介导的内皮细胞摄取、紧密连接调控引起的通透性改变, 以及在炎症或神经退行性疾病等病理状态下血脑屏障通透性的增加, 这些机制协同作用使外泌体能够有效跨越血脑屏障, 参与大脑的生理和病理过程^[5]。Pla-Exos 可以将药物包裹进入囊泡中, 从而透过 BBB 将药物递送到发病部位, 使得药物的疗效增加, 进而减少不良反应的产生^[6,7]。目前, Pla-Exos 载药治疗中枢神经系统疾病的研究仍处于探索阶段, 希望通过 Pla-Exos 的低免疫原性、生物相容性和屏障穿透能力为疾病的治疗提供新的策略^[8]。基于此, 本研究选择以 Pla-Exos 为载体, 超声共孵育法制备载葛根素血浆外泌体 (plasma exosomes carrying puerarin, Pue-Exos)。旨在探究 Pue-Exos 制备工艺, 并通过体外模拟 BBB 模型观察 Pue-Exos 的透过能力, 为载葛根素外泌体的新剂型的研发提供理论和实验依据。

材料与方 法

材料与动物 磁珠捕获试剂盒 (奥秘佳得公司); 葛根素 (上海源叶生物科技有限公司); CCK-8 试剂盒

(碧云天生物科技有限公司); BCA 试剂盒 (索莱宝公司); Anti-CD63 抗体 (Affinity Biosciences 公司); Anti-TSG101 抗体、Anti-CD81 (Abcam 公司); 辣根过氧化物酶标记的羊抗兔 IgG H&L (北京博奥森生物技术有限公司); ECM 内皮培养基、C6 细胞专用培养基 (Icell 公司); 人脐静脉内皮细胞 (HUVECs)、大鼠脑胶质瘤细胞 (C6) (上海生命科学研究院细胞资源中心); SD 大鼠购自斯贝福生物技术有限公司, 许可证号 SCXK (京) 2019-0010, 本研究经河北北方学院动物伦理审查委员会批准, 伦理审批号: HBNV202307012103。

仪器 3K30 型高速低温离心机 (Sigma 公司); XPN-100 超速离心机 (贝克曼库尔特公司); 7650 型透射电子显微镜 (日立公司); ZETASIZER Nanoseries 纳米粒度电位仪 (英国马尔文仪器有限公司); Infinite 200 PRO 多功能酶标仪 (澳大利亚 Tecan 公司); FM0530 多色荧光和化学发光成像系统 (Protein Simple 公司); Lab Tech UV2100 紫外分光光度计 (北京莱伯泰科有限公司)。

Pla-Exos 提取及纯化

SD 大鼠血浆分离 采用标准化实验方法选择体重 300 ± 20 g、7 周龄的 SD 雄性大鼠进行实验。实验前一晚禁食自由饮水。将大鼠随机分为 3 组, 进行血浆提取。参考文献^[9]报道, 大鼠麻醉后腹主动脉取血。血样在 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、 $2.5 \times 10^3 \times \text{g}$ 的条件下离心 15 min, 共两次。离心后收集血浆, 将样本保存在 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 的冰箱中备用。

Pla-Exos 提取与纯化 SD 大鼠血浆和无菌过膜磷酸缓冲盐溶液 (phosphate-buffered saline, PBS) 按照 1:4 的比例进行稀释, 在 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、 $1.5 \times 10^4 \times \text{g}$ 的条件下离心 30 min, 去除没有完全分离的红细胞和细胞碎片。使用 $0.22\text{ }\mu\text{m}$ 的微孔滤膜过滤上清液, 将过滤好的上清液存放于离心管中备用。在 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、 $1.5 \times 10^5 \times \text{g}$ 的条件下离心 2.5 h。去上清, 底部沉淀即为外泌体, 使用过膜 PBS 重悬沉淀, 并用 3 种方法对其进行纯化。① 超速离心法: 在提取的外泌体中加入预冷的 PBS 溶液, 在 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、 $1.5 \times 10^5 \times \text{g}$ 的条件下离心 2.5 h, 进行外泌体纯化; ② 磁珠捕获法: 将磁珠添加到离心后的悬液中, 然后在 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下孵育 1 h。离心使磁珠沉淀, 使用洗脱液将磁珠上的外泌体洗脱下来, 即可获得纯化后的外泌体

溶液; ③ 超滤法: 将外泌体溶液加入 100 kDa 的超滤管中, 加入预冷的 PBS, 在 4 °C、 $1.3 \times 10^4 \times g$ 的条件下离心 15 min, 重复 4 次, 使外泌体充分纯化。

Pla-Exos 表征 通过纳米粒度电位仪、蛋白质免疫印迹法 (Western blot) 及透射电镜对纯化后 Pla-Exos 进行鉴定。通过纳米粒度电位仪分析不同方法纯化得到的 SD 大鼠血浆外泌体的粒径大小。Western blot 法检测 Pla-Exos 中 TSG101 (1:10 000)、CD63 (1:1 000)、CD81 (1:10 000) 蛋白表达水平。将 Pla-Exos 溶液滴于铜网上, 使外泌体溶液的小部分自然地吸附于铜网的碳膜上, 在室温下静置 5~10 min。在铜网上滴加 2% 的磷钨酸溶液进行负染约 5 min, 通过透射电镜观察 SD 大鼠血浆外泌体形态。

Pla-Exos 纯化回收率测定及经济学考察 使用 BCA 法测定 3 种纯化方法样本的蛋白质量浓度, 根据损耗比例, 评估 3 种方法的回收率。通过统计 3 种纯化方法损耗的时间及经济, 对不同方法进行对比分析。

Pue-Exos 制备及表征

葛根素紫外分析方法确立 使用甲醇将葛根素溶解成 $20 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 对照品溶液, 在紫外分光光度计 200~600 nm 内进行全波长扫描, 确定葛根素的吸收波长。精密称取 5 mg 的葛根素标准品, 用甲醇溶解并稀释, 定容于 10 mL 量瓶, 分别配制成质量浓度为 2、4、6、8、10 和 $12 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的溶液, 在最大吸收波长处检测并绘制标准曲线。分别对葛根素进行精密度实验、回收率实验及重复性实验。① 精密度实验: 配置质量浓度为 8、10、 $12 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的葛根素溶液, 每日 8、10、12、14 和 16 点记录吸光度值, 计算日内精密度; 连续 5 天 10 点记录 8、10、 $12 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 溶液的吸光度值, 计算日间精密度; ② 回收率实验: 配置质量浓度为 8、10、 $12 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的葛根素溶液, 测量吸光度值, 计算回收率; ③ 重复性实验: 制备质量浓度为 $10 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的葛根素溶液, 均匀取出 6 份, 测量吸光度值, 计算相对标准偏差 (RSD) 值, 评价方法的重现性。

Pue-Exos 的制备 取一定质量浓度外泌体溶液与葛根素溶液混合, 使用超声波细胞破碎仪进行超声处理, 以工作 15 s、间歇 15 s、持续 1.5 min、冰上降温 2 min 为 1 个周期, 重复 3 次。在超声处理后, 为恢复外泌体膜的稳定性, 将获得的混合溶液在 37 °C 条件下孵育。将获得的载药外泌体上清液再次使用磁珠提取的方式进行药物和外泌体的分离。

单因素考察 考察孵育时间、超声功率及 Pla-Exos 与葛根素的质量比对包封率 (encapsulation efficiency, EE) 的影响。固定超声功率为 26 W, 质量比为 10:1, 改变孵育时间分别为 0.5、0.75、1、1.25 和 1.5 h, 以评估

孵育时间对 EE% 的影响; 在保持孵育时间 1 h, 质量比为 7.5:1 的条件下, 调整超声功率为 13、26、39、52 和 65 W, 探究超声功率对 EE% 的影响; 在 26 W 的超声功率、1 h 的孵育时间下, Pla-Exos 与葛根素的质量比为 5:1、7.5:1、10:1、12.5:1 和 15:1, 观察质量比对 EE% 的影响。根据公式 (1) 计算 EE%, 根据公式 (2) 计算质量比。

$$EE\% = \left(\frac{M_{\text{Pue-Exos}}}{M_{\text{Pue}}} \right) \times 100\% \quad (1)$$

$$\text{质量比} = \left(\frac{M_{\text{Pla-Exos}}}{M_{\text{Pue}}} \right) \times 100\% \quad (2)$$

其中, $M_{\text{Pue-Exos}}$ 为载葛根素外泌体中葛根素质量, M_{Pue} 为葛根素投药量, $M_{\text{Pla-Exos}}$ 为血浆外泌体质量。

响应曲面设计法考察最佳处方及验证 选择超声功率、孵育时间、质量比 3 个因素作为自变量, 并将这 3 个因素在单因素实验中的最佳值及其临近值作为各自的 3 个水平。使用统计软件 Design-Expert 12, 以 EE% 作为响应值, 设计 Box-Behnken 实验。通过对模型的拟合得出最佳处方条件。根据这些条件对 Pue-Exos 进行重复制备, 对 3 次重复实验的 EE% 进行测定以验证最优条件的可重复性。

Pue-Exos 稳定性考察 将制备好的 Pue-Exos 和 Pla-Exos 分别保存在 4、-20 和 -80 °C 的条件下, 连续 7 天内, 每天用纳米粒度电位仪进行 3 次粒径测量, 以观察这 7 天内 Pue-Exos 和 Pla-Exos 的粒径变化情况。

Pue-Exos 体外释放度考察 将含药量相同的葛根素、Pue-Exos 加入透析袋中, 置于 37 °C 的 PBS 中 (pH 为 7.4), 转速为 $100 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$, 于 0.5、1、2、3、4、6、8、10、12、24、36、48 和 72 h 时各取 1 mL, 同时补入 1 mL 的溶出介质, 通过紫外分光光度计测定吸光度值, 计算各组葛根素的含量和累积释放率, 并绘制葛根素、Pue-Exos 的溶出曲线。

Pue-Exos 表征分析 Pue-Exos 的表征测定方法与 Pla-Exos 一致。

Pue-Exos 血脑屏障透过能力的考察

模型建立 将 HUVECs 和 C6 细胞进行共培养, 以构建模拟生理条件的体外 BBB 模型。将 HUVECs 细胞悬液以 $1.6 \times 10^4 \text{ well}^{-1}$ 的细胞密度接种于 24 孔 Transwell 小室的 PET 膜上, 每孔加入 250 μL 内皮细胞专用培养基; 同时, 以 $1 \times 10^5 \text{ well}^{-1}$ 的细胞密度将 C6 细胞接种在 Transwell 24 孔板的下室中, 每孔加入 1 mL C6 专用培养基, 以保持两种细胞培养基液面的均衡。设定单细胞组 (只含 HUVECs) 和空白对照组, 每组设立 3 个复孔。接种完成后, 将培养板放置于细胞培养箱中静置培养, 定期换液并观察细胞融合状态。

模型评价 在细胞达到基本融合的状态后,使用倒置显微镜观察 HUVECs 和 C6 细胞的生长状态及融合情况。之后进行 4 h 渗漏实验和跨内皮电阻抗 (trans endothelial electrical resistance, TEER) 实验进一步评估模型的完整性。在 Transwell 小室的上室每孔中加入 300 μL 的 HUVECs 专用培养基, 下室每孔中加入 1.5 mL C6 细胞专用培养基, 使得上室和下室之间的液面差至少达到 0.5 cm。在细胞培养箱中培养 4 h, 观察 4 h 后的液面差。使用 Millicell ERS-2 电阻仪对外 BBB 模型进行 TEER 检测。吸除 Transwell 小室内的培养基, 并加入适量体积的 D-Hanks 缓冲液以保持两室液面一致。将电极膜片分别垂直放入液面下方, 避免触碰小室底部及周边。在 3 个不同的位置测量电阻值, 根据公式 (3) 计算实际电阻值:

$$\text{实际电阻值 } (\Omega \cdot \text{cm}^2) = (\text{实验孔测量值} - \text{空白孔测量值}) \times \text{PET 膜面积 } (\text{cm}^2) \quad (3)$$

其中, PET 膜面积为 0.33 cm^2 。

葛根素、Pue-Exos 对 C6、HUVECs 细胞存活率的影响 将处于对数生长期的 C6 细胞以 $8 \times 10^3 \text{ well}^{-1}$ 的密度接种于 96 孔板培养 24 h。分别将不同质量浓度的葛根素、Pue-Exos (12.5、25、37.5 和 50 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) 加入孔中, 继续培养 24 h。使用 CCK-8 试剂盒进行检测, 每孔加入 10 μL CCK-8 试剂, 置于细胞培养箱中孵育 2 h。终止显色, 使用酶标仪于 450 nm 处测定各孔吸光度值 (A)。HUVECs 细胞数量为 $2 \times 10^4 \text{ well}^{-1}$, 其余方法相同。

Pue-Exos 对 BBB 通透性考察 取 25 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的 Pue-Exos 溶液和葛根素溶液各 100 μL 分别加入上室中, 将小室放置于细胞培养箱中进行培养。4 h 后, 使用紫外分光光度计检测下室中葛根素含量。通过下室中穿透的葛根素含量与初始加入的葛根素含量的比率来评估透过能力。

统计学处理 实验结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 通过 Graph-Pad.Prism 9.5 软件进行数据处理和统计学分析, 对各组实验进行单因素方差分析, 对组间差异进行 *t* 检验, $P < 0.05$ 有统计学差异, $P < 0.01$ 统计学差异显著。

结果

1 Pla-Exos 提取及纯化

1.1 纯化后 Pla-Exos 表征分析 通过纳米粒度电位仪对 3 种纯化方法提取的 Pla-Exos 进行粒径分析。结果显示外泌体粒径集中在 30~150 nm 内, 粒径峰值出现在 60~110 nm 处 (图 1)。Western blot 法检测 TSG101、CD63、CD81, 3 种蛋白均显著表达。通过透射电镜进行形态分析, 图像显示不同方法提取纯化的外泌体均具有良好的双层膜囊泡结构, 且大多数样本的囊泡直

径与纳米粒径结果范围一致 (图 2)。

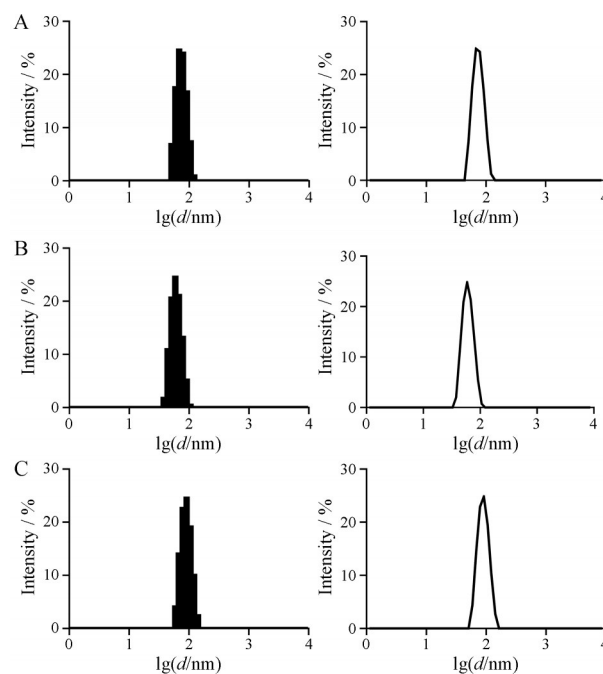


Figure 1 Particle size distribution of purified plasma exosomes (Pla-Exos). A: Ultracentrifugation; B: Magnetic bead capture method; C: Ultrafiltration

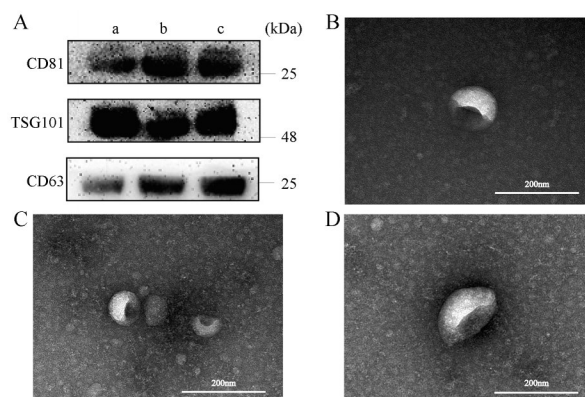


Figure 2 Purified Pla-Exos labeled protein and TEM image of Exos purified by different methods. A: Purified Pla-Exos labeled protein (a: Ultracentrifugation; b: Magnetic bead capture method; c: Ultrafiltration); B: Ultracentrifugation; C: Magnetic bead capture method; D: Ultrafiltration ($\times 30\ 000$). TEM: Transmission electron microscopy

1.2 Pla-Exos 纯化回收率测定及经济学考察 通过 BCA 试剂盒获得的蛋白标准曲线, 标准曲线方程为: $Y = 0.8402X + 0.1104$, $R^2 = 0.9990$, 在 SD 大鼠血浆外泌体的纯化过程中, 对比各种方法的回收率, 超速离心法纯化的外泌体蛋白损失最多 ($P < 0.001$), 磁珠捕获法蛋白损失相对较低 ($P < 0.01$)。为了全面评估每一种纯化技术的实用性, 比较了它们在纯化时间和所需

成本方面的差异。磁珠捕获法对比超高速离心法,成本下降 ($P < 0.001$), 时间减少 ($P < 0.01$); 超滤法同样成本和时间都有所减少 ($P < 0.001$) (图3)。

2 Pue-Exos制备及表征

2.1 葛根素紫外分光光度计分析方法确立 使用紫外分光光度计在 200~600 nm 内进行全波长扫描, 葛根素标准品溶液在 250 nm 处有最大吸收峰。以质量浓度 (C) 为横坐标, 吸光度值 (A) 为纵坐标绘制标准曲线, 得到 $Y = 0.0698X - 0.0218$, $R^2 = 0.9996$ 的标准曲线, 葛根素标准品溶液在 2~12 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 质量浓度范围内, 线性关系良好。① 精密度实验: 对照品溶液吸光度的日内 RSD 分别为 1.12%、0.67%、1.29% ($n = 5$), 日间 RSD 分别为 1.13%、2.49%、1.11% ($n = 5$), 表明仪器精密度良好; ② 回收率实验: 样品的加样回收率分别为 99.88% (RSD = 0.47%, $n = 3$)、99.82% (RSD = 0.29%, $n = 3$)、100.16% (RSD = 0.23%, $n = 3$), RSD 值均 $< 3\%$, 符合方法学要求, 表明该方法稳定性良好; ③ 重复性实验: 对照品溶液 RSD = 0.24% ($n = 5$), 表明本方法重复性良好。

2.2 Pue-Exos制备条件单因素考察实验 ① 孵育时间对包封率的影响: 固定超声功率和质量比, 随着孵育时间增加 EE% 表现为先增加后减少, 在孵育时间为 1 h 时, EE% 达到最大; ② 超声功率对包封率的影响: 随着超声功率的增加, EE% 先升高后降低。在超声功率为 39 W 时, EE% 达到最大; ③ 质量比对包封率的影响: 固定超声功率和孵育时间, EE% 同样先升高再降低, 在质量比为 10:1 时, EE% 达到最大 (图3)。

2.3 响应曲面设计法优化最佳处方 利用 Design Expert 12 软件进行 3 因素 3 水平的多元线性及二项式拟合, 确定最优处方参数。超声功率和孵育时间、质量比的用量取值情况详见表 1, 实验安排及结果见表 2。结果显示, 二次多项式回归模型是描述各因素与指标关系的最佳模型, 数学模型如下: $Y = 28.93 + 1.38X_1 - 1.28X_2 - 1.08X_3 + 0.0125X_1X_2 + 0.0750X_1X_3 - 0.0275X_2X_3 - 4.99X_1^2 - 7.72X_2^2 - 3.67X_3^2$ ($R^2 = 0.9975$), 方差分析如表 3 所示。模型相关系数为 $R^2 = 0.9975$, 说明模型良好, 能较好地反映响应值的变化, 可以继续使用此模型来分析和预测实验条件。通过 Design-Expert 12 软件生成 3 个因素对 EE% 的响应面图和等高线图 (图 4)。结合外泌体制备的实际情况, 确定外泌体的最优处方: (A) 孵育时间 = 1 h, (B) 超声功率 = 39 W, (C) 质量比 = 10:1, 预测 EE% 为 29.16%。经 BBD 确定的最优处方条件重复制备 Pue-Exos, 3 次重复试验的 EE% 分别 30.24%、29.46%、29.19%, 平均为 $(29.63 \pm 0.55)\%$ 。RSD 小于 3%。EE% 结果与数学模型预测的数据接近。

2.4 Pue-Exos表征分析 经纳米粒度电位仪检测, 载药后的 Pue-Exos 粒径比 Pla-Exos 稍大, 粒径仍在 30~

Table 1 Factors and levels code

Level	Single factor		
	A	B	C
	Incubation time/h	Ultrasonic power/W	Mass ratio
1	0.75	26	7.5
2	1	39	10
3	1.25	52	12.5

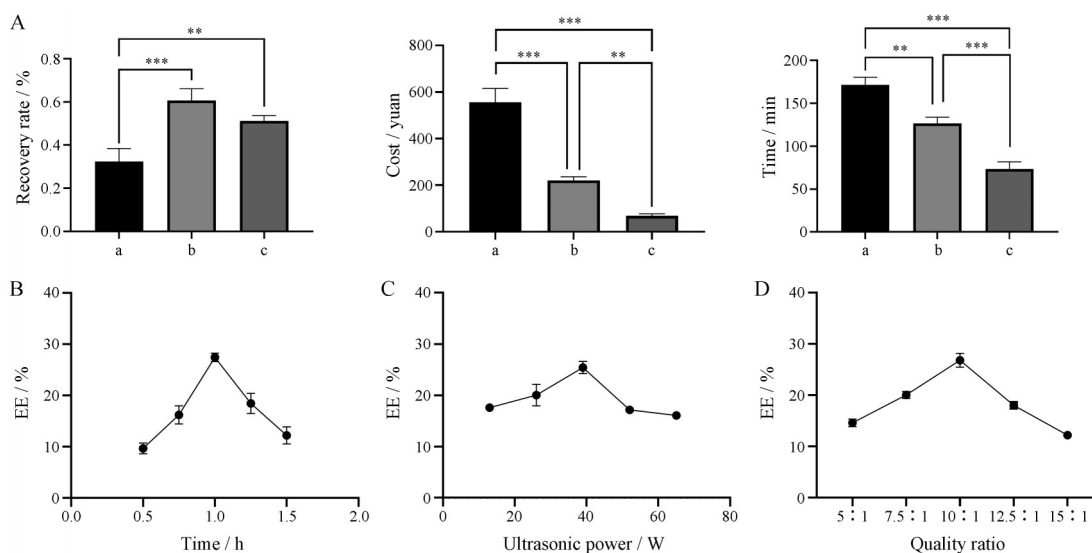


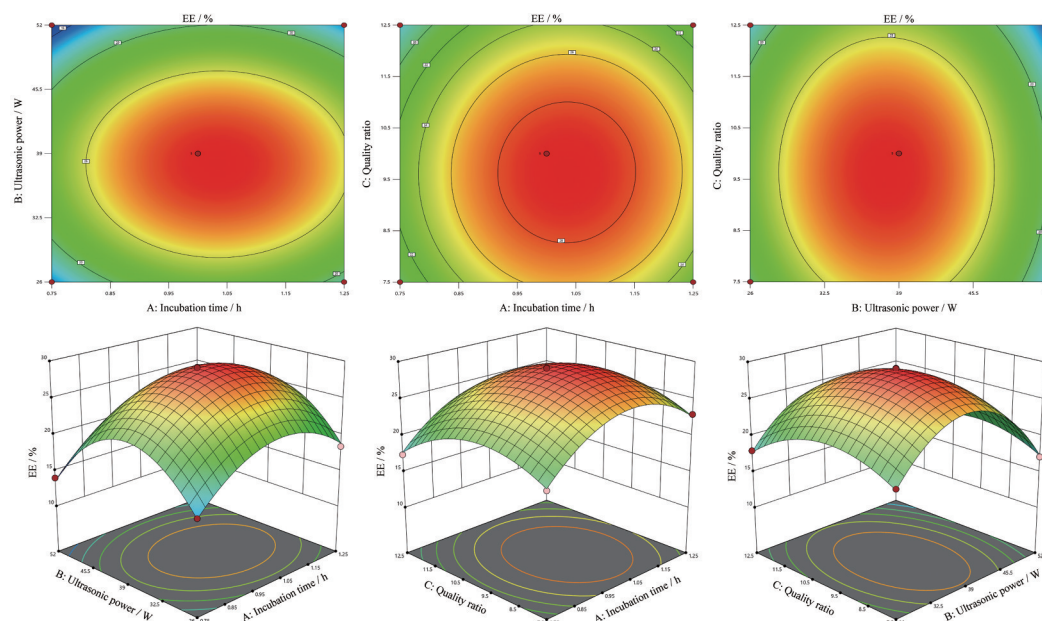
Figure 3 Efficiency evaluation of purifying exosomes and single-factor investigation of drug loading. A: Pla-Exos purification recovery determination and economics examination (a: Ultracentrifugation; b: Magnetic bead capture method; c: Ultrafiltration). $n = 3$, $\bar{x} \pm s$. ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$; B: Effect of incubation time on encapsulation rate; C: Effect of ultrasonic power on encapsulation rate; D: Effect of mass ratio on encapsulation rate. EE: Encapsulation efficiency

Table 2 Plan and results of Box-Behnken trials

Number	A		B		C		EE/%
	Incubation time/h	Ultrasonic power/W	Ultrasonic power/W	Mass ratio	Ultrasonic power/W	Mass ratio	
1	1	39	39	10	10	10	28.79
2	0.75	26	26	10	10	10	16.21
3	0.75	39	39	12.5	12.5	12.5	17.43
4	1.25	52	52	10	10	10	16.27
5	1	39	39	10	10	10	29.1
6	1.25	39	39	12.5	12.5	12.5	20.87
7	1.25	26	26	10	10	10	18.43
8	1	52	52	12.5	12.5	12.5	15
9	1	26	26	7.5	7.5	7.5	20.03
10	1	39	39	10	10	10	29.15
11	1	39	39	10	10	10	28.45
12	1.25	39	39	7.5	7.5	7.5	22.96
13	1	52	52	7.5	7.5	7.5	17.14
14	0.75	52	52	10	10	10	14
15	0.75	39	39	7.5	7.5	7.5	19.82
16	1	39	39	10	10	10	29.16
17	1	26	26	12.5	12.5	12.5	18

Table 3 Analysis results of variance

Source of variance	Sum of square	Degree of freedom	Meansquare	F	P
Model	492.48	9.00	54.72	312.17	< 0.000 1
A-Incubation time	15.32	1.00	15.32	87.39	< 0.000 1
B-Ultrasonic power	13.16	1.00	13.16	75.07	< 0.000 1
C-Mass ratio	9.35	1.00	9.35	53.36	0.000 2
AB	0.000 6	1.00	0.000 6	0.003 6	0.954 1
AC	0.022 5	1.00	0.022 5	0.128 4	0.730 7
BC	0.003 0	1.00	0.003 0	0.017 3	0.899 2
A ²	104.74	1.00	104.74	597.51	< 0.000 1
B ²	250.62	1.00	250.62	1 429.73	< 0.000 1
C ²	56.79	1.00	56.79	323.97	< 0.000 1
Residual	1.23	7.00	0.175 3		
Lack of fit	0.846 8	3.00	0.282 3	2.97	0.160 2
Pure error	0.380 2	4.00	0.095 1		
Cor total	493.71	16.00			

**Figure 4** Response surface and contour diagrams

150 nm 之内。Western blot 证实 Pla-Exos 与 Pue-Exos 均稳定表达 TSG101、CD63 及 CD81 蛋白。使用透射电镜对 Pue-Exos 的形态进行分析, 结果表明载药后的外泌体仍具有完整的双层膜结构 (图 5)。

2.5 Pue-Exos 稳定性考察 在 4、-20 和 -80 °C 的环境下, 7 天内分别使用纳米粒度电位仪粒径测量, Pla-Exos、Pue-Exos 的粒径变化较小 (图 6A、B), 表明提取出来的外泌体和载药后的外泌体都呈现稳定状态。

2.6 Pue-Exos 体外释放度考察 通过计算不同时间葛根素的含量和累积释放率, 绘制葛根素、Pue-Exos 的溶出曲线。葛根素显示出更快的释放速率, 在 8 h 时累积释放率高达 55%, 且在 48 h 时累积释放率增高至 80%。Pue-Exos 中的葛根素被外泌体包裹, 使得葛根素释放更加缓慢和平稳, 从 0 至 72 h 时累积释放率缓慢增加至 80% (图 6C)。

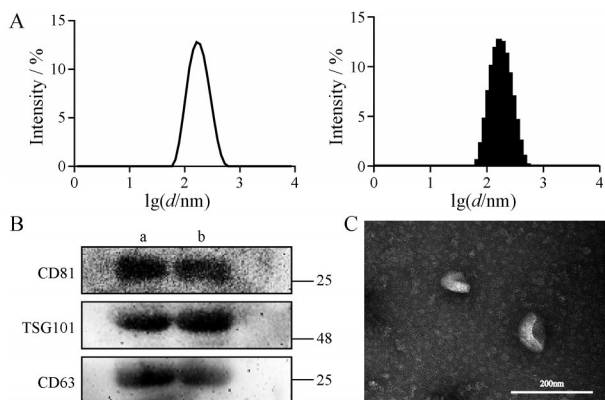


Figure 5 The features of plasma exosomes carrying puerarin (Pue-Exos). A: Particle size; B: Marker proteins (a: Exos marker protein; b: Pue-Exos marker protein); C: Transmission electron microscopy ($\times 30\ 000$)

3 Pue-Exos 血脑屏障透过性的考察

3.1 体外血脑屏障细胞模型的建立与评价 倒置显微镜下观察到 Transwell 上室中的 HUVECs 细胞呈梭形, 生长速度减慢, 细胞逐渐靠拢, 形成较为紧密的单层屏障结构。4 h 渗漏实验中观察 Transwell 小室上下液面差, 结果表明, 与单独培养 HUVECs 细胞模型相比, 共培养 HUVECs 和 C6 细胞的模型仍可维持大于 0.5 cm 的液面差, 表明共培养 HUVECs 和 C6 细胞的模型可以更好地阻拦液体的渗漏 (图 7)。TEER 实验中, 共培养 HUVECs 和 C6 细胞的模型比单独培养 HU-

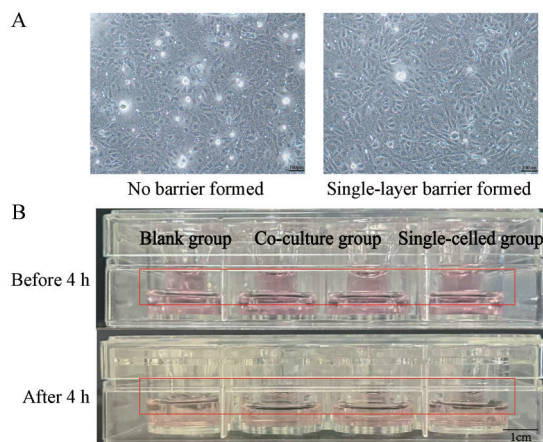


Figure 7 Cell morphology observation and leakage test results. A: Cell morphology of HUVECs ($\times 100$); B: Results of 4 h leakage test

VECs 细胞的模型生成的 TEER 值更高。在实验的第 6、7 天时, 差异变得更加显著。统计分析显示共培养条件下的 TEER 值显著高于单独培养条件 ($P < 0.05$), 并且共培养模型最终达到的 TEER 值高于 $200\ \Omega$, 符合后续实验的应用标准 (图 8A)。

3.2 葛根素、Pue-Exos 对 C6、HUVECs 细胞存活率的影响 给予不同质量浓度的葛根素、Pue-Exos (12.5 、 25 、 37.5 和 $50\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$), 培养 24 h。C6 细胞的 CCK-8 结果表明, 不同质量浓度的葛根素对细胞没有显著影

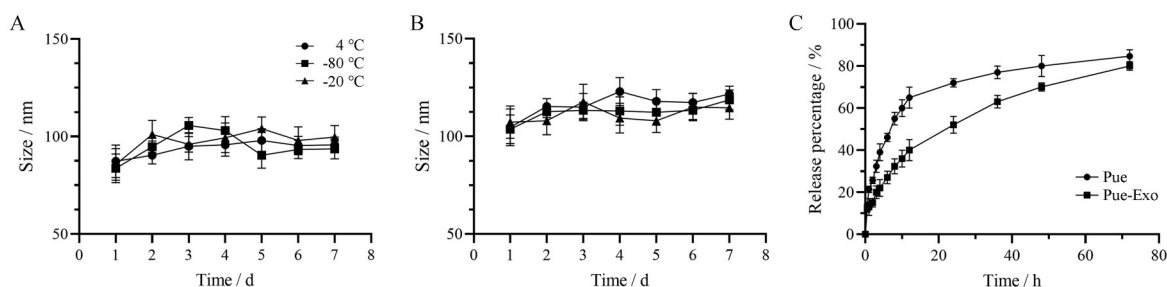


Figure 6 The stability and *in vitro* release experiment of Pue-Exos. A: Stability examination of Pla-Exos; B: Stability examination of Pue-Exos; C: Release curve *in vitro*. $n = 3$, $\bar{x} \pm s$

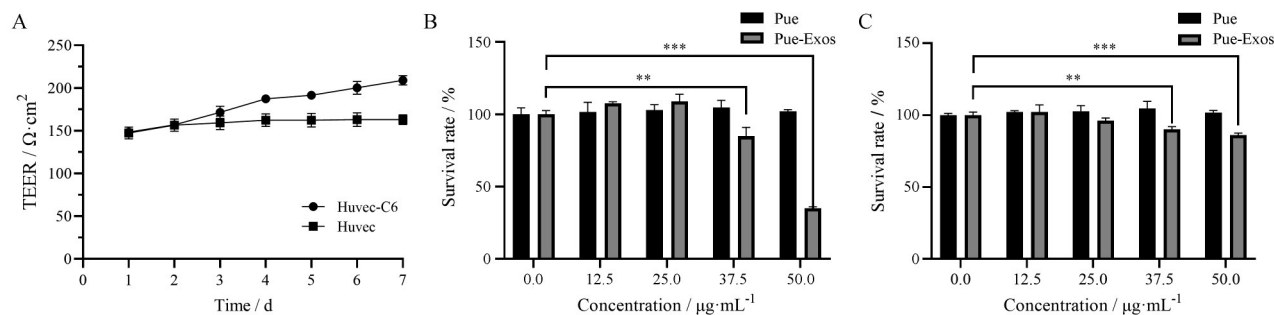


Figure 8 BBB model TEER assay and cell viability analysis. A: TEER values of *in vitro* BBB models in co-culture group and single cell group; B: Effect of different concentrations of Pue and Pue-Exos on C6 cell survival; C: Effect of different concentrations of Pue and Pue-Exos on HUVECs cell survival. BBB: Blood-brain barrier; TEER: Trans endothelial electrical resistance. $n = 3$, $\bar{x} \pm s$. ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$

响,但是 Pue-Exos 在质量浓度 $37.5 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 时,存活率有所下降 ($P < 0.01$),质量浓度在 $50 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 时,存活率下降较多 ($P < 0.001$),HUVECs 细胞的 CCK-8 结果表明,不同质量浓度对细胞也没有显著影响,但是 Pue-Exos 在质量浓度 $37.5 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 时,存活率有所下降 ($P < 0.01$),质量浓度在 $50 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 时,存活率下降较多 ($P < 0.001$) (图 8B、C)。

3.3 Pue-Exos 血脑屏障透过性的考察 体外 BBB 模型中, Pue-Exos 在 4 h 后的透过率与原料药相比有所提升 ($P < 0.01$) (图 9)。

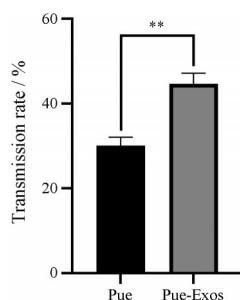


Figure 9 *In vitro* BBB model transmission efficiency. A: Pue group; B: Pue-Exos group. Compared with Pue group, $n = 3$, $\bar{x} \pm s$. ** $P < 0.01$

讨论

葛根素可以通过不同途径发挥抗高血压、抗炎及神经保护作用,但其低水溶性和低生物利用度导致药物开发受限^[10,11]。研究人员已探索了固体分散和脂质体等制剂来提高葛根素的水溶性和生物利用度,但仍需要更深层次地考察剂型安全性和有效性^[12,13]。外泌体是一种普遍存在于细胞内的小囊泡,在细胞间通信、疾病生物标志物研究和药物传递领域具有潜在的临床应用价值。

外泌体的分离是研究的基础,本实验使用超速离心法对 Pla-Exos 进行初步分离,通过对比超速离心法、磁珠捕获法和超滤法的纯化效果,选取了磁珠捕获法作为纯化的最终方法。两种方法的结合,不仅提升了外泌体的纯度,并且在操作时间上也更为有效率。超速离心法和磁珠法的结合有效地避免了单一方法的缺点,为外泌体的高效回收和质量控制提供了新途径。未来研究中可以进一步优化纯化过程中的参数设置,例如磁珠表面修饰的种类和密度,以期实现更高效地纯化并获取更高的产量。外泌体能够针对性地装载各类药物,包括小分子化药、核酸和中药单体,并具有良好的靶向特点^[14-18]。本实验利用超声共孵育的方法制备了 Pue-Exos,超声波利用机械振动促进物质间隙增加,从而提高药物分子进入外泌体的可能性。在超声

载药完成后,使用共孵育的方式恢复膜结构。使用单因素和响应面的方法制备了载药量高、可重复的 Pue-Exos。由于药物进入了外泌体的内部,增加了整体的粒径,TEM 下的双层膜结构和标志蛋白的存在说明了超声共孵育的方法并没有破坏外泌体的本身特性。Pue-Exos 的稳定性良好,并能够减缓药物的释放。未来可以通过进一步研究 Pue-Exos 在生物体内的药效学和药理学,促进该技术的进一步研发。

构建符合人体生理结构的体外 BBB 模型对于中枢神经系统疾病的研究和药物研发具有重要意义^[19,20]。课题组前期研究表明^[21],HUVECs 与 C6 细胞共培养模型可以有效地模拟体内的 BBB 并全面地反映 BBB 的复杂性。相较于原料药, Pue-Exos 展现出了更高的透过效率。这一结果揭示了外泌体作为药物递送系统的潜力。然而,外泌体在提高药物穿透 BBB 能力上的确切机制,仍需更深入地研究。了解外泌体与 BBB 之间的特定受体,对药物递送系统的设计和优化至关重要。未来研究中应继续考察外泌体在 BBB 中的透过特性,以优化药物运送效率和特异性。

综上所述,本研究展示了不同分离技术对外泌体纯度和回收率的影响,通过超声共孵育法制备出结构完整、稳定且高效携带药物的外泌体。在体外 BBB 模型中,外泌体携带的药物显示出良好的穿透能力。

作者贡献: 张奇负责实验设计、实施、论文撰写;李炜、赵振奥负责指导实验设计和实施;张鑫参与了药物制剂实验;郝路格参与了部分细胞实验;张胜霄、张健东参与了实验数据分析。

利益冲突: 本文所有作者声明不存在利益冲突关系。

References

- [1] Liu X, Huang R, Wan JY. Puerarin: a potential natural neuroprotective agent for neurological disorders [J]. *Biomed Pharmacother*, 2023, 162: 114581.
- [2] Zhou YX, Zhang H, Peng C. Puerarin: a review of pharmacological effects [J]. *Phytother Res*, 2014, 28: 961-975.
- [3] Krylova SV, Feng DR. The machinery of exosomes: biogenesis, release, and uptake [J]. *Int J Mol Sci*, 2023, 24: 1337.
- [4] Kalluri R, LeBleu VS. The biology, function, and biomedical applications of exosomes [J]. *Science*, 2020, 367: eaaug977.
- [5] Abdelsalam M, Ahmed M, Osaid Z, et al. Insights into exosome transport through the blood-brain barrier and the potential therapeutic applications in brain diseases [J]. *Pharmaceuticals (Basel)*, 2023, 16: 571.
- [6] Jiang YB. Preparation of Plasma Exosomes as Drug Carriers and Their Protective Mechanism against Cerebral Ischemia-Reperfusion Injury (血浆外泌体作为药物载体的制备及其对脑缺血再

- 灌注损伤保护机制研究) [D]. Jinzhou: Jinzhou Medical University, 2022.
- [7] Huang LJ. Preparation of Plasma Exosomes as Drug Carrier and Study on Synergistic Effect of Plasma Exosomes Loaded Ginkgolide B on Improving Cognitive Function in Dementia Model (血浆外泌体作为药物载体的制备及探讨其负载银杏内酯B在痴呆模型中对改善认知功能协同作用的研究) [D]. Jinzhou: Jinzhou Medical University, 2021.
- [8] Ha D, Yang NN, Nadithe V. Exosomes as therapeutic drug carriers and delivery vehicles across biological membranes: current perspectives and future challenges [J]. *Acta Pharm Sin B*, 2016, 6: 287-296.
- [9] Lindstrom NM, Moore DM, Zimmerman K, et al. Hematologic assessment in pet rats, mice, hamsters, and gerbils: blood sample collection and blood cell identification [J]. *Vet Clin North Am Exot Anim Pract*, 2015, 18: 21-32.
- [10] Shi WL, Yuan R, Chen X, et al. Puerarin reduces blood pressure in spontaneously hypertensive rats by targeting eNOS [J]. *Am J Chin Med*, 2019, 47: 19-38.
- [11] Yuan Y, Zhou H, Wu QQ, et al. Puerarin attenuates the inflammatory response and apoptosis in LPS-stimulated cardiomyocytes [J]. *Exp Ther Med*, 2016, 11: 415-420.
- [12] Wang BJ, Hang HF, Wang H, et al. Preparation of puerarin long circulating liposomes and its effect on osteoporosis in castrated rats [J]. *J Pharm Sci*, 2024, 113: 1823-1835.
- [13] Lv JY, Shi SQ, Zhang BX, et al. Role of puerarin in pathological cardiac remodeling: a review [J]. *Pharmacol Res*, 2022, 178: 106152.
- [14] Li Q, Wang X, Du LN. Application of exosomes in brain-targeted delivery [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2022, 57: 658-669.
- [15] Zhang YY, Chen LQ, Liu X, et al. Advances in research on exosomes as drug delivery vehicles [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2019, 54: 1010-1016.
- [16] González-Sarrías A, Iglesias-Aguirre CE, Cortés-Martín A, et al. Milk-derived exosomes as nanocarriers to deliver curcumin and resveratrol in breast tissue and enhance their anticancer activity [J]. *Int J Mol Sci*, 2022, 23: 2860.
- [17] Zhao JW, Li Y, Jia RR, et al. Mesenchymal stem cells-derived exosomes as dexamethasone delivery vehicles for autoimmune hepatitis therapy [J]. *Front Bioeng Biotechnol*, 2021, 9: 650376.
- [18] Huang ZX, Guo L, Huang LJ, et al. Baicalin-loaded macrophage-derived exosomes ameliorate ischemic brain injury via the antioxidative pathway [J]. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*, 2021, 126: 112123.
- [19] Kim BK, Canonica J, Roudnicky F, et al. Preventing VEGF-mediated vascular permeability by experimentally potentiating BBB characteristics in endothelial cells [J]. *Methods Mol Biol*, 2022, 2475: 259-274.
- [20] Cohen J, D'Agostino L, Tuzer F, et al. HIV antiretroviral therapy drugs induce premature senescence and altered physiology in HUVECs [J]. *Mech Ageing Dev*, 2018, 175: 74-82.
- [21] An ZX, Zhang Q, Shi CY, et al. Preparation and *in vitro* evaluation of lactoferrin-modified liposomes of codonopsis pilosula polysaccharide [J]. *Chin J Mod Appl Pharm (中国现代应用药学)*, 2023, 40: 1317-1329.