透明质酸-青蒿琥酯聚合物胶束对脂多糖诱导的炎症巨噬细胞的杀伤作用

朱溶月，李依凡，刘艳华，杨嘉玉*
（宁夏医科大学药学院，宁夏银川 750004）

摘要：以己二酸二酰肼（ADH）为连接臂，制备透明质酸-青蒿琥酯（HA-ADH-**1**），再采用超声分散法制成聚合物胶束，对其体外表征和体内外抗炎作用进行考察。透射电镜和动态光散射研究表明，HA-ADH-**1** 胶束呈类球形，平均粒径为 170.90 nm。HA-ADH-**1** 胶束中的 **1** 在 pH 7.4 的生理环境中 48 h 累积释放率小于 50%，远低于游离 **1** 组，证明 HA-ADH-**1** 胶束具有缓释特性，且结构稳定。细胞毒性和摄取试验结果显示，HA-ADH-**1** 胶束依靠结合巨噬细胞表面高表达的 CD44 受体，可特异性靶向脂多糖诱导的炎症巨噬细胞，增加 **1** 在细胞内的蓄积量，因此对炎症巨噬细胞有较好的杀伤效果。

关键词：青蒿琥酯；透明质酸；聚合物胶束；巨噬细胞；抗炎
中图分类号：R944.9　　**文献标志码**：A　　**文章编号**：1001-8255(2023)07-1075-07
DOI：10.16522/j.cnki.cjph.2023.07.013

Killing Effect of Hyaluronic Acid-artesunate Polymeric Micelles on Inflammatory Macrophages Induced by Lipopolysaccharide

ZHU Rongyue, LI Yifan, LIU Yanhua, YANG Jiayu*
(*School of Pharmacy, Ningxia Medical University, Yinchuan 750004*)

ABSTRACT: Using adipic acid dihydrazide(ADH) as a linkage, the polymer hyaluronic acid(HA)-ADH-artesunate(**1**) was synthesized. Then, the polymeric micelles of HA-ADH-**1** were prepared by ultrasonic dispersion. Their characteristics *in vitro* and anti-inflammatory effects *in vitro* and *in vivo* were investigated. The observation of transmission electron microscopy revealed that the HA-ADH-**1** micelles was spherical, and the results of dynamic light scattering showed that the average particle size of HA-ADH-**1** micelles was 170.90 nm. The cumulative release at 48 h of **1** from HA-ADH-**1** micelles in the physiological environment(pH 7.4) was less than 50%, which was much lower than that of free **1**, indicating that HA-ADH-**1** micelles had sustained-release property and stable structure. The cytotoxicity and uptake assay results showed that HA-ADH-**1** micelles could bind to CD44 receptors highly expressed on the macrophage surface, showing specific targeting to inflammatory macrophages induced by lipopolysaccharide, then enhanced the intracellular accumulation of **1**. Therefore, the micelles demonstrated a better killing effect on inflammatory macrophages.

Key Words: artesunate; hyaluronic acid; polymeric micelle; macrophage; anti-inflammatory

巨噬细胞可通过分泌基质细胞衍生因子和促炎细胞因子来发挥机体免疫调节作用和介导炎症反应。人体单核细胞作为巨噬细胞主要的来源，经过机体血液循环系统而广泛分布于全身组织，并逐渐分化形成巨噬细胞。近年来研究[1]显示，单核细胞衍生的巨噬细胞在慢性疾病模型中占主导地位并驱动炎症反应，可能决定着慢性疾病的发展，或炎症的发生和消退。青蒿琥酯（artesunate，**1**）为一种低毒、高效的潜在免疫抑制剂[2]，不仅能调节

收稿日期：2022-08-15
基金项目：宁夏自然科学基金项目(2023AAC03173)
作者简介：朱溶月(1980—)，女，硕士，从事药物制剂及辅料的研究。
通信作者：杨嘉玉(1994—)，女，硕士，讲师，从事药物新剂型与新技术研究。
E-mail：lyanhua1214@126.com

NF-κB 信号通路、抑制脂多糖（LPS）对巨噬细胞的刺激，还能减少肿瘤坏死因子 -α（TNF-α）的释放，最终使巨噬细胞分泌的炎症因子减少，发挥抗炎活性[3]。但长期大量应用 **1** 会导致严重的不良反应，如胰岛素抵抗、肥胖等，并且 **1** 水溶性差、难吸收、易降解，限制了临床应用。因此，本研究以己二酸二酰肼（ADH）为连接臂，将透明质酸（hyaluronic acid，HA）与 **1** 连接得到聚合物（HA-ADH-**1**），再将其制成聚合物胶束；并以高表达 CD44 受体的炎症巨噬细胞为模型，考察所得制品的体内外抗炎作用。

1　仪器与试药

A0R0X-300 型核磁共振仪（瑞士 BRUKER 公司）；FD-1C 型冷冻干燥机（北京得天佑仪器有限公司）；Zetasizer Nano ZS90 型激光粒度仪（英国马尔文公司）；Infinite 200 Pro 型酶标仪（美国 Bio-Rad 公司）；371 型二氧化碳培养箱（美国 Thermo 公司）；H-7650 型透射电镜（日本日立公司）；流式细胞仪（美国 BD 公司）。

1（成都德思特生物技术有限公司，含量 98%，批号 DST200513-091）；透明质酸（HA，华熙福瑞达生物化工有限公司，批号 1210121）；ADH（批号 219332）、1- 乙基 -（3- 二甲基氨基丙基）碳二亚胺盐酸盐（EDC·HCl）、4- 二甲氨基吡啶（DMAP）和异硫氰酸荧光素（FITC）（上海阿拉丁生化科技股份有限公司）；*N*,*N*- 二甲基甲酰胺（DMF，上海麦克林生化科技股份有限公司）；MTT（美国 Sigma 公司）；TNF-α ELSIA 试剂盒（武汉伊莱瑞特生物技术股份有限公司）；DMEM 培养基（美国 Gibco 公司）；青霉素、链霉素（北京索莱宝生物科技有限公司）；胎牛血清（上海生物科技有限公司）；完全弗氏佐剂（CFA，北京博蕾德科技发展有限公司）。

SD 大鼠（6 ～ 8 周，180 ～ 220 g）均购于宁夏医科大学实验动物中心，动物合格证编号 SCXK（宁）2020-0081，并依托于宁夏医科大学动物中心平台进行以下试验。

小鼠骨髓来源巨噬细胞（RAW 264.7 细胞）购自中国科学院典型培养物保藏委员会细胞库。

2　方法与结果

2.1　HA-ADH-**1** 聚合物胶束的制备与表征

HA-ADH-**1** 聚合物的制备：精密称取 HA 200 mg 溶于水中，加入 ADH 46 mg 和 EDC·HCl 50 mg，反应期间用 1 mol/L 盐酸调节反应液的 pH 值，使其始终保持在 4.75 ～ 5.5，反应过夜，用 1 mol/L 氢氧化钠溶液调节 pH 值至中性，终止反应。反应液置透析袋（截留分子量 3 500）中透析 72 h，冷冻干燥，得白色冻干产物 HA-ADH。精密称取 HA-ADH 80 mg 溶于适量纯水中；另精密称取 **1** 172.8 mg 溶于 DMF 5 mL 中，并加入 EDC·HCl 172 mg 和 DMAP 109 mg，反应活化 3 h。在冰水浴条件下，将上述 HA-ADH 水溶液缓慢滴加到 **1** 的 DMF 溶液中反应过夜，透析 72 h，冻干得到产物 HA-ADH-**1**。图 1 为 HA-ADH-**1** 的合成路线。

HA-ADH-**1** 的核磁氢谱表征结果如图 2A 所示。**1** 中甲基的特征峰出现在 δ 0.84 ～ 0.91 和 δ 5.67 ～ 5.75 处。HA 糖环上的甲基质子（—$NHCOCH_3$）和亚甲基的质子信号峰出现在 δ 1.98 ～ 4.50 处，表明 HA-ADH-**1** 已被成功合成。根据 **1** 中甲基质子［—OCH（CH）O—，δ 5.73］与 HA 中的甲基质子（—$NHCOCH_3$，δ 4.46）的相对强度比，可计算出 **1** 嫁接在 HA-ADH-**1** 上的取代度和含量分别为 11% 和 10%。

HA-ADH-**1** 聚合物胶束的制备：采用溶剂挥发法制备聚合物胶束。精密称取 HA-ADH-**1** 1.00 mg，溶于纯水 200 μL 中，磁力搅拌数小时使之在水中自组装，定容至 1 mg/mL。

HA-ADH-**1** 聚合物胶束的体外表征：采用透射电镜观察到 HA-ADH-**1** 聚合物胶束呈现大小均一的球形颗粒（图 2B）。HA-ADH-**1** 胶束的平均粒径为（170.90±1.00）nm，粒度分布曲线如图 2C 所示；由于胶束外壳存在大量的羧基，其 ζ 电位为（－23.5±1.5）mV，有助于维持胶束的体外稳定性。

2.2　HA-ADH-**1** 聚合物胶束的体外释放度

精密量取一定体积的 **1** 和 HA-ADH-**1** 聚合物胶束溶液（约含 **1** 800 μg/mL），分别置透析袋（截留分子量 3 500）中，然后放入磷酸盐缓冲液（PBS，含 0.5% 的十二烷基硫酸钠，pH 7.4）50 mL 中，置摇床中缓慢振摇（37 ℃，100 r/min）。分别在 0.5、1、2、4、6、8、12、24 和 48 h 时取样 5 mL，同

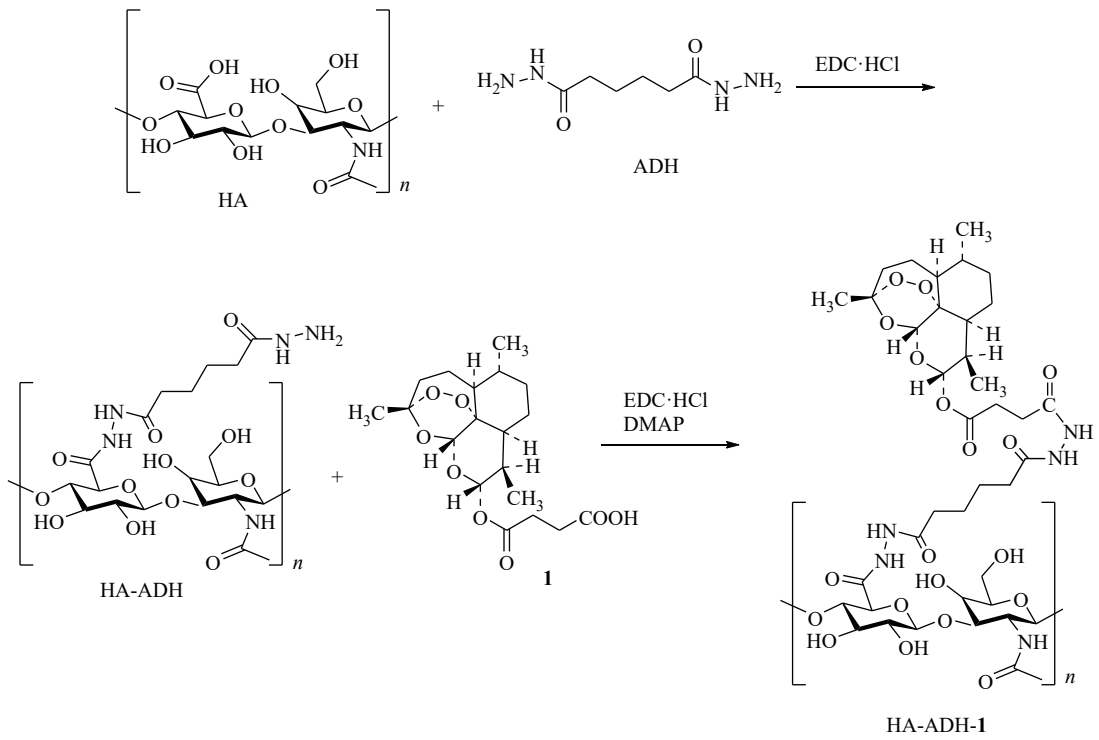


图 1 HA-ADH-1 的合成路线

Fig.1 Synthetic Route of HA-ADH-**1**

时补充同温等量释放介质。采用紫外分光光度法在 205 nm 处测定 **1** 溶液和 HA-ADH-**1** 聚合物胶束中 **1** 的含量，绘制释放曲线。

如图 2D 所示，游离 **1** 溶液释放速率较快，孵育 10 h 时的累积释放率已达到 80%，并在 48 h 内几乎完全释放。而 HA-ADH-**1** 聚合物胶束在 48 h 内累积释放率始终小于 50%，释放速率远低于游离 **1** 溶液。这可能是 HA-ADH-**1** 聚合物胶束中 **1** 的释放需要经历 HA-ADH-**1** 聚合物中化学键的断裂、胶束溶蚀等过程，显示 HA-ADH-**1** 聚合物胶束具有一定的缓释特性，具有在体内长循环的潜力。

2.3 体外抗炎作用研究

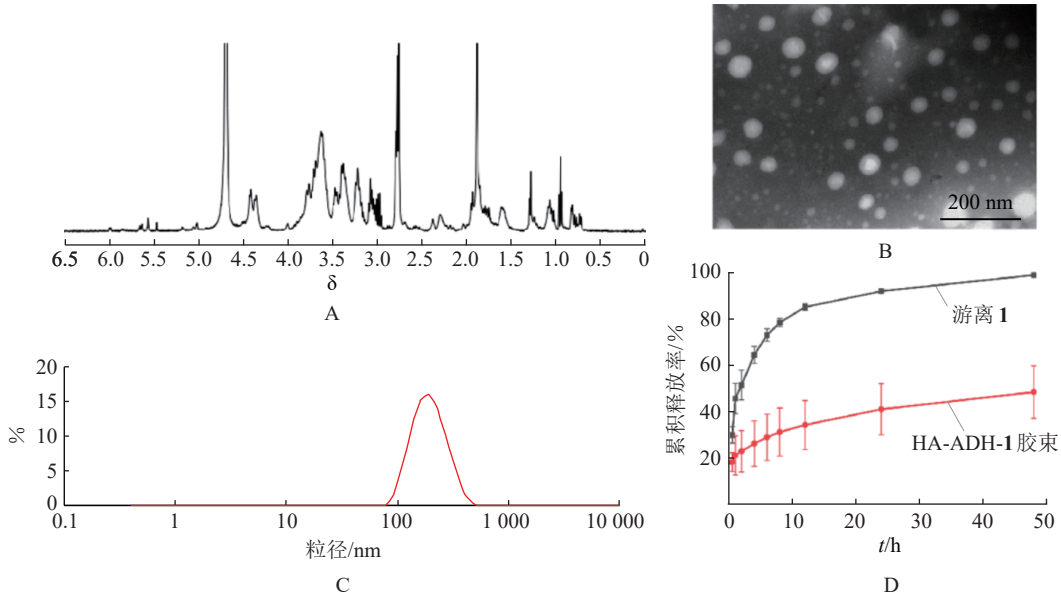
2.3.1 RAW 264.7 细胞摄取机制研究

细胞培养：将 RAW 264.7 细胞置含 10%胎牛血清、100 u/mL 青霉素和链霉素的 DMEM 培养基中，于 37 ℃、5% CO_2 培养箱中培养。取处于对数生长期的细胞用于试验研究。

FITC 标记的 HA-ADH-**1**（FITC-HA-ADH-**1**）聚合物胶束：精密称取 HA-ADH-**1** 聚合物 10.00 mg、EDC·HCl 20 mg 溶于纯水 4 mL 中，室温下反应 3 h 后，逐滴加入含 FITC 2 mg 的 DMSO（100 μL）溶液，避光、室温反应过夜，透析 48 h。

将 RAW 264.7 细胞以每孔 2×10^5 个的密度接种到载有盖玻片的 6 孔细胞培养板中，并在含有 LPS（1 μg/mL）的情况下培养 24 h[4]。弃去旧培养液，分别给予无血清培养基稀释的 FITC 溶液与 FITC-HA-ADH-**1** 胶束溶液（FITC 的质量浓度均为 10 μg/mL），然后培养 2 h，再弃去培养液，用 PBS（4 ℃）终止细胞摄取，胰酶消化，收集，离心，用 PBS（4 ℃）制成单细胞悬液，经流式细胞仪检测 FITC 的荧光强度。另取经 LPS 活化的 RAW 264.7 细胞，加入 10 mg/mL 游离 HA 孵育 2 h 后再同上加入 FITC 溶液与 FITC-HA-ADH-**1** 聚合物胶束溶液（FITC 的质量浓度均为 10 μg/mL），同法操作后采用流式细胞仪检测 FITC 的荧光强度。

结果如图 3A 所示，FITC 溶液在活化的巨噬细胞中显示出一定的荧光信号，可能是 FITC 溶液以小分子形式快速被动扩散所致；而 FITC-HA-



A—HA-ADH-**1** 的核磁氢谱；B—HA-ADH-**1** 聚合物胶束的透射电镜照片（×200）；
C—HA-ADH-**1** 聚合物胶束的粒度分布曲线；D—游离 **1** 溶液和 HA-ADH-**1** 聚合物胶束中 **1** 的释放曲线（*n*=3）。

图 2　HA-ADH-1 聚合物胶束的体外表征结果

Fig.2　*In vitro* Characterization Results of HA-ADH-**1** Polymeric Micelles

ADH-**1** 聚合物胶束在活化 RAW 264.7 巨噬细胞中显示出较强的荧光信号。此外，在活化巨噬细胞的 CD44 受体竞争性抑制试验研究中，HA 游离溶液预处理后，活化巨噬细胞中 FITC-HA-ADH-**1** 胶束的荧光信号降低。以上研究结果表明活化巨噬细胞表面有 CD44 受体表达，游离 HA 预处理会竞争性地结合 CD44 受体，阻碍 HA-ADH-**1** 聚合物胶束的内吞，造成 FITC 荧光信号减弱，说明 HA-ADH-**1** 聚合物胶束依赖 CD44 受体进入巨噬细胞[5]。

2.3.2　胞内释放研究

照“**2.3.1**”项下方法培养细胞，接种于 6 孔细胞培养板中，并用 LPS（1 μg/mL）诱导刺激 24 h[4]，然后分别加入游离 **1** 溶液和 HA-ADH-**1** 聚合物胶束溶液（**1** 质量浓度为 1 μg/mL），于 6、12、24 和 48 h 时取样，裂解、提取细胞蛋白后通过 HPLC 法测定 **1** 的含量。

色谱条件：色谱柱　Diamonsil C_{18} 柱（4.6 mm×250 mm，5 μm）；流动相　乙腈和 0.5%乙酸水溶液（体积比 65 ∶ 35）；检测波长　210 nm；柱温　25 ℃；流速　1 mL/min；进样量　10 μL。

1 溶液和 HA-ADH-**1** 聚合物胶束在活化 RAW 264.7 巨噬细胞中 **1** 的释放量如图 3B 所示。不同孵育时间内 HA-ADH-**1** 聚合物胶束在活化 RAW 264.7 巨噬细胞的 **1** 释放量均显著高于游离 **1** 溶液。结合上述细胞摄取结果来看，被活化的巨噬细胞摄取后，HA-ADH-**1** 聚合物胶束可能被有效酶解，加快了 HA-ADH-**1** 聚合物中 **1** 断裂出来的速度，并增强了其胞内 **1** 的蓄积量，有利于 HA-ADH-**1** 聚合物胶束发挥更强的抗炎作用。

2.3.3　HA-ADH-**1** 聚合物胶束对 RAW 264.7 细胞的毒性

通过考察 HA-ADH-**1** 聚合物胶束对活化 RAW264.7 细胞增殖的抑制作用，研究其抗炎效果。以每孔 1×10^4 个的密度将 RAW 264.7 细胞接种到 96 孔细胞培养板，用培养液（含 LPS 1 μg/mL）孵育过夜。LPS 组更换新鲜培养液，试验组分别加入梯度浓度的 **1** 溶液和 HA-ADH-**1** 聚合物胶束溶液继续孵育 72 h[6]。孵育结束后加入 MTT 溶液（5 mg/mL）继续孵育 4 h，弃去上清液，加入 DMSO 溶解甲臜结晶，采用酶标仪测定 492 nm 波长下的吸光度。

如图 4A 所示，经不同质量浓度的游离 **1** 溶液和 HA-ADH-**1** 聚合物胶束孵育 72 h 后，巨噬细胞的存活率随 **1** 质量浓度的增加而下降，且 HA-ADH-**1** 聚合物胶束处理组抑制巨噬细胞增殖的效果更显著。在 **1** 质量浓度为 0.01、0.1、1 μg/mL 时，**1** 与 HA-ADH-**1** 聚合物胶束的细胞增殖抑制作用无显著差异，但当 **1** 质量浓度为 10 和 50 μg/mL 时，HA-ADH-**1** 聚合物胶束处理组的细胞存活率低于 50%，其细胞毒性显著强于游离 **1** 溶液。推测原因可能是 HA-ADH-**1** 聚合物胶束与巨噬细胞表面 CD44 受体结合，加速了细胞摄取，从而显示出更强的抑制细胞增殖的作用，说明 HA-ADH-**1** 聚合物胶束能更好地治疗炎症相关疾病。

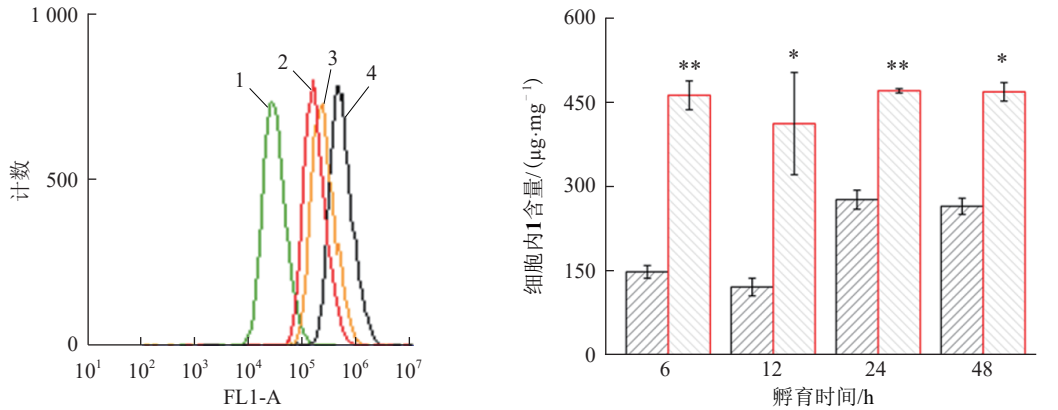
2.3.4 HA-ADH-**1** 聚合物胶束的细胞炎症因子抑制作用

以每孔 2×10^2 个的密度将 RAW 264.7 细胞接种到 12 孔细胞培养板中，并用含 1 μg/mL LPS 的培养液分别诱导刺激 24 h，然后分别加入 **1** 和 HA-ADH-**1** 聚合物胶束溶液（**1** 质量浓度为 1 μg/mL）继续孵育 24 h[7]，设置空白组（无 LPS 处理）和炎症对照组（经 LPS 处理，但无药物处理）。采用 ELISA 检测各组细胞上清液中 TNF-α 的含量。如图 4B 所示，与空白组比较，经 LPS 刺激的 RAW 246.7 细胞内炎症因子 TNF-α 的表达水平均明显上调，证明 LPS 已成功诱导巨噬细胞产生炎症反应。但经游离 **1** 溶液和 HA-ADH-**1** 聚合物胶束治疗后，活化巨噬细胞分泌的 TNF-α 含量均显著减少，其中，HA-ADH-**1** 聚合物胶束处理组的 TNF-α 表达水平降幅更大，说明 HA-ADH-**1** 聚合物胶束可抑制活化巨噬细胞的增殖，并导致其分泌炎症因子的能力受阻，可用于治疗炎症相关疾病。

2.4 体内抗炎作用研究

在大鼠右足足砣皮下注入 CFA（10 mg/mL）100 μL，14 d 后成功建立佐剂诱导型关节炎（AIA）大鼠模型。将受试大鼠随机分为空白对照组（健康大鼠）、生理盐水（每只给予 500 μL）组、**1** 组和 HA-ADH-**1** 聚合物胶束组（后二组 **1** 的给药剂量均为 2.5 mg/kg），每组 3 只。各试验组大鼠分别于 d14、d17、d20、d23 和 d26 尾静脉注射给药 500 μL。末次给药 24 h 后，取下大鼠右爪关节浸入到 4% 多聚甲醛溶液中固定 48 h，脱钙后制片，采用苏木精 - 伊红（HE）染色和番红 O（safranin O）- 固绿染色，进行组织病理学分析。

结果如图 5 所示，空白对照组大鼠无滑膜炎和



A—流式细胞分析结果；B—HA-ADH-**1** 聚合物胶束在 LPS 诱导的 RAW 264.7 细胞内的 **1** 释放量（与游离 **1** 溶液处理组相比，* 表示 $P<0.05$，** 表示 $P<0.01$；$n=3$）。

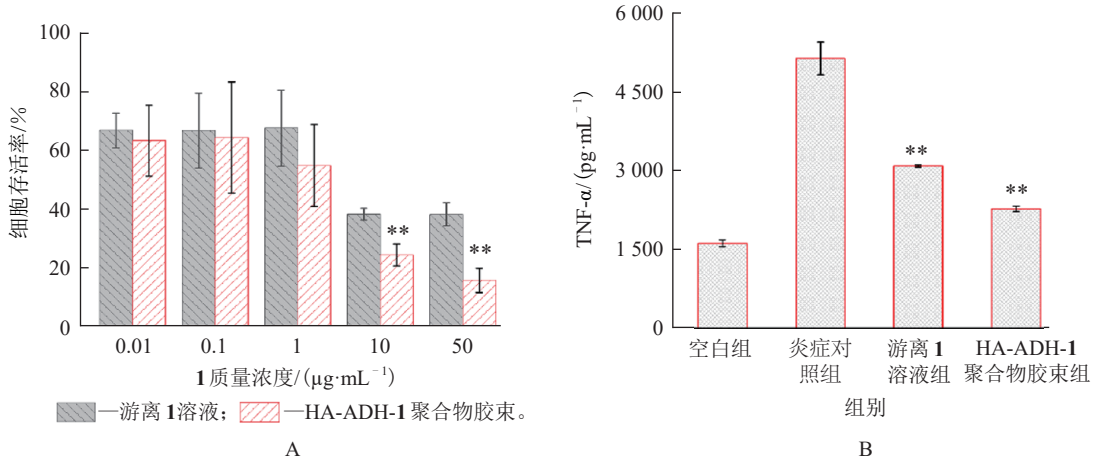
图 3 HA-ADH-1 聚合物胶束的摄取与胞内释放

Fig.3 Uptake and Intracellular Release of HA-ADH-**1** Polymeric Micelles

软骨损伤的征象，并且软骨与骨之间的界面形态明显。生理盐水处理的 AIA 大鼠表现出严重的炎症细胞浸润和软骨损伤，组织切片中难以识别完整的关节腔，且难以区分骨与软骨之间的界面。而经 **1** 和 HA-ADH-**1** 聚合物胶束治疗后，滑膜炎症和软骨侵蚀均有不同程度缓解；并且明显可见 HA-ADH-**1** 聚合物胶束减轻炎症细胞浸润和软骨破坏的作用比 **1** 更强。上述关节组织学分析进一步证实了 HA-ADH-**1** 聚合物胶束对滑膜炎和软骨损伤 AIA 大鼠的治疗作用。

3　讨论

由感染或刺激引发的炎症是人体免疫系统启动的第一步反应，与免疫细胞如巨噬细胞、单核细胞和中性粒细胞的组织浸润有关。过量氧化剂及炎症部位的 pH 值下降，会导致严重的组织破坏，以及炎症趋化因子和细胞因子（如 TNF-α、白细胞介素 -1 和白细胞介素 -6 等）的分泌[8—11]，最终导致组织坏死、低血压和其他潜在的严重脓毒症样



A—HA-ADH-**1** 聚合物胶束的细胞毒性（与游离 **1** 溶液处理组相比，** 表示 $P<0.01$；$n=3$）；
B—HA-ADH-**1** 聚合物胶束对 TNF-α 表达的影响（与炎症对照组相比，** 表示 $P<0.01$；$n=3$）。

图 4　HA-ADH-1 聚合物胶束的体外抗炎作用

Fig.4　*In vitro* Anti-inflammatory Effect of HA-ADH-**1** Polymeric Micelles

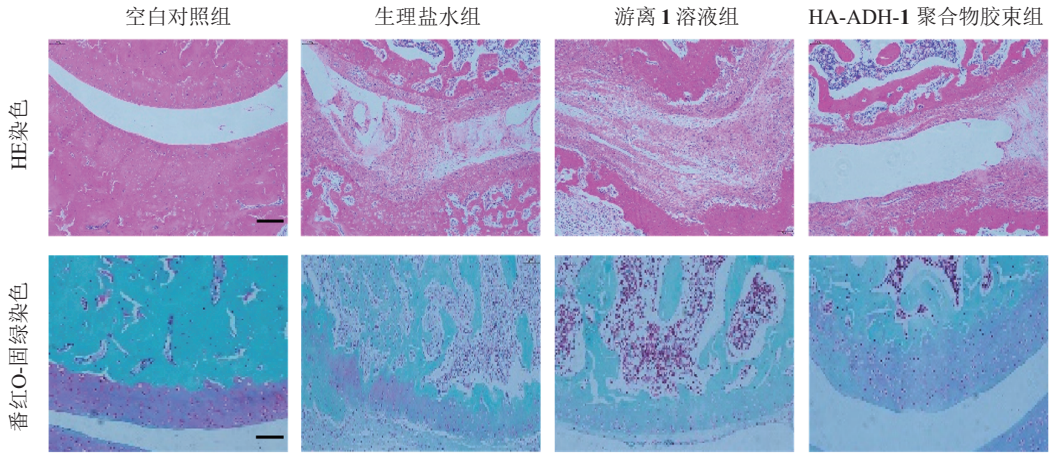


图 5　AIA 大鼠踝关节 HE 染色和番红 O- 固绿染色的代表性图像（标尺：100 μm）

Fig.5　Representative Images of HE Staining and Safranin-O & Fast Green Staining of AIA Rat Ankle Joints (Scale Bar: 100 μm)

毒性[12]。在炎症反应过程中，巨噬细胞表面高表达 CD44 受体，通过其胞膜表面表达的 Toll 样受体 4（TLR4）等模式识别受体，识别 LPS 等病原或损伤相关分子模式，参与炎症疾病的发生与发展[13]。因此，抑制炎症巨噬细胞的活化增殖可能是治疗炎症相关疾病的有效策略[14]。基于此，本研究构建了 HA-ADH-**1** 聚合物胶束用于活化巨噬细胞的抗炎活性研究。结果表明，该胶束有效抑制了 LPS 诱导的巨噬细胞的炎症反应，并在 AIA 大鼠体内试验中也表现出抗炎作用，提示其在炎症相关疾病的临床应用中具有一定潜力。

参考文献：

[1] GINHOUX F, GUILLIAMS M. Tissue-resident macrophage ontogeny and homeostasis [J]. *Immunity*, 2016, **44**(3): 439-449.

[2] FARMANPOUR-KALALAGH K, BEYRAGHDAR KASHKOOLI A, BABAEI A, *et al*. Artemisinins in combating viral infections like SARS-CoV-2, inflammation and cancers and options to meet increased global demand [J]. *Front Plant Sci*, 2022, **13**: 780257.

[3] KIM J M, JEONG J G, HO S H, *et al*. Protection against collagen-induced arthritis by intramuscular gene therapy with an expression plasmid for the interleukin-1 receptor antagonist [J]. *Gene Ther*, 2003, **10**(18): 1543-1550.

[4] NI R R, SONG G J, FU X H, *et al*. Reactive oxygen species-responsive dexamethasone-loaded nanoparticles for targeted treatment of rheumatoid arthritis via suppressing the iRhom2/TNF-α/BAFF signaling pathway [J]. *Biomaterials*, 2020, **232**: 119730.

[5] TEAN T H, RASTOGI R, SHELKE J, *et al*. Modulation of macrophage functional polarity towards anti-inflammatory phenotype with plasmid DNA delivery in CD44 targeting hyaluronic acid nanoparticles [J]. *Sci Rep*, 2015, **5**: 16632.

[6] YANG T, YU S Y, LIU L, *et al*. Dual polymeric prodrug co-assembled nanoparticles with precise ratiometric co-delivery of cisplatin and metformin for lung cancer chemoimmunotherapy [J]. *Biomater Sci*, 2020, **8**(20): 5698-5714.

[7] LAN Y, LIANG Q W, SUN Y, *et al*. Codelivered chemotherapeutic doxorubicin via a dual-functional immunostimulatory polymeric prodrug for breast cancer immunochemotherapy [J]. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2020, **12**(28): 31904-31921.

[8] CHUNG M F, CHIA W T, WAN W L, *et al*. Controlled release of an anti-inflammatory drug using an ultrasensitive ROS-responsive gas-generating carrier for localized inflammation inhibition [J]. *J Am Chem Soc*, 2015, **137**(39): 12462-12465.

[9] PU H L, CHIANG W L, MAITI B, *et al*. Nanoparticles with dual responses to oxidative stress and reduced pH for drug release and anti-inflammatory applications [J]. *ACS Nano*, 2014, **8**(2): 1213-1221.

[10] ITO T, FRASER I P, YEO Y, *et al*. Anti-inflammatory function of an *in situ* cross-linkable conjugate hydrogel of hyaluronic acid and dexamethasone [J]. *Biomaterials*, 2007, **28**(10): 1778-1786.

[11] XU Q S, LIU M S, LIU Q S, *et al*. The inhibition of LPS-induced inflammation in RAW264.7 macrophages via the PI3K/Akt pathway by highly *N*-acetylated chitooligosaccharide [J]. *Carbohydr Polym*, 2017, **174**: 1138-1143.

[12] ABRAMS M T, KOSER M L, SEITZER J, *et al*. Evaluation of efficacy, biodistribution, and inflammation for a potent siRNA nanoparticle: effect of dexamethasone co-treatment [J]. *Mol Ther*, 2010, **18**(1): 171-180.

[13] VIDYA M K, KUMAR V G, SEJIAN V, *et al*. Toll-like receptors: significance, ligands, signaling pathways, and functions in mammals [J]. *Int Rev Immunol*, 2018, **37**(1): 20-36.

[14] HAMIDZADEH K, CHRISTENSEN S M, DALBY E, *et al*. Macrophages and the recovery from acute and chronic inflammation [J]. *Annu Rev Physiol*, 2017, **79**: 567-592.