

# 功能化外泌体载人参皂苷 Rg1 治疗缺血性脑卒中

雒慧钧, 黄芷璇, 史一杰\*

锦州医科大学药学院, 辽宁 锦州 121000

雒慧钧, 黄芷璇, 史一杰. 功能化外泌体载人参皂苷 Rg1 治疗缺血性脑卒中[J]. 生物工程学报, 2023, 39(1): 275-285.

LUO Huijun, HUANG Zhixuan, SHI Yijie. Functionalized exosome-loaded ginsenoside Rg1 for the treatment of ischemic stroke[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2023, 39(1): 275-285.

**摘要:** 本研究旨在探讨 c(RGDyK)肽修饰的骨髓间充质干细胞外泌体作为一种多功能载体材料负载人参皂苷 Rg1 (ginsenoside Rg1, G-Rg1)对缺血性脑卒中的治疗效果和潜在作用机制。以线栓法制备 SD 大鼠短暂性大脑中动脉缺血性模型(transient middle cerebral occlusion model, tMCAO), 并将造模成功的 SD 大鼠随机分为 tMCAO 组、Exo 组、游离 G-Rg1 组、Exo-Rg1 组和 cRGD-Exo-Rg1 组, 并以 sham 组作为对照。采用 2,3,5-三苯基四氯化铵(2,3,5-triphenyltetrachloride, TTC)染色法检测脑梗死体积; 免疫荧光法观察神经元、血管内皮细胞数量变化; Western blotting 实验检测相关蛋白的表达。结果表明 cRGD-Exo-Rg1 可通过激活 PI3K/AKT 通路上调血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)和缺氧诱导因子(hypoxia-inducible factors, HIF-1 $\alpha$ )的表达, 促进血管生成和神经生成, 有效减少脑梗死体积, 改善神经功能。另外 cRGD-Exo-Rg1 进入到缺血脑组织后可以上调 occudin 和 claudin-5 的表达, 减轻血脑屏障(blood-brain barrier, BBB)损伤。综上所述, cRGD-Exo-Rg1 治疗效果显著, 能够通过促进血管生成和神经生成, 起到治疗缺血性脑卒中的作用, 并为其他神经保护治疗方式的潜在临床益处提供实验依据。

**关键词:** 人参皂苷 Rg1; 缺血性脑卒中; 血管生成; 外泌体; 血脑屏障

## Functionalized exosome-loaded ginsenoside Rg1 for the treatment of ischemic stroke

LUO Huijun, HUANG Zhixuan, SHI Yijie\*

School of Pharmacy, Jinzhou Medical University, Jinzhou 121000, Liaoning, China

**Abstract:** The aim of this study was to investigate the therapeutic effects and potential

资助项目: 辽宁省教育厅青年项目(JYTQN2020015)

This work was supported by the Liaoning Educational Committee (JYTQN2020015).

\*Corresponding author. E-mail: shiyijie119@jzmu.edu.cn

Received: 2022-04-04; Accepted: 2022-07-05

mechanism of c(RGDyK) peptide modified mesenchymal stem cell exosomes loaded with ginsenoside Rg1 (G-Rg1) on ischemic stroke. Thread-tying method was used to establish SD rats transient middle cerebral occlusion model (tMCAO). The model rats were randomly divided into tMCAO group, Exo group, free G-Rg1 group, Exo-Rg1 group and cRGD-Exo-Rg1 group, and sham group was used as control. The infarct volume was measured by 2,3,5-triphenyltetrachloride (TTC) staining, the changes of neuron and endothelium were observed by immunofluorescence, and the expression of related proteins was detected by Western blotting. The results showed that cRGD-Exo-Rg1 up-regulated the expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) and hypoxia-inducible factors (HIF-1 $\alpha$ ) by activating PI3K/AKT pathway, thus promoting angiogenesis and neurogenesis, effectively reducing the volume of cerebral infarction and improving neural function. In addition, the delivery of cRGD-Exo-Rg1 to ischemic brain tissue up-regulated the expression of occludin and claudin-5, and reduced the injury of blood-brain barrier. Taken together, cRGD-Exo-Rg1 was effective in the treatment of ischemic stroke by promoting angiogenesis and neurogenesis, which provided experimental evidence for the potential clinical benefits of other neuroprotective therapies.

**Keywords:** ginsenoside Rg1; ischemic stroke; angiogenesis; exosome; blood-brain barrier

缺血性脑卒中的特征在于由脑血流供应不足引起的脑组织缺血和缺氧, 它的治疗主要涉及保护神经元、减少梗塞体积和降低神经元死亡, 其中恢复脑血流量和挽救垂死的神经元被认为是缺血性脑损伤的有效疗法<sup>[1]</sup>。重组组织纤溶酶原激活剂(recombinant tissue plasminogen activator, rt-PA)是美国食品药品监督管理局(Food and Drug Administration, FDA)批准用于治疗急性脑梗塞的唯一药物, 但是由于其治疗时间窗口窄且与出血性并发症相关, 大多数患者无法从中受益<sup>[2-3]</sup>, 必须开发新的疗法来治疗大部分缺血性脑损伤的患者。因此, 寻找一种有效的神经保护药物, 设计一种新型的给药系统, 以及提高药物靶向性具有重要意义<sup>[4]</sup>。

人参皂苷 Rg1 (ginsenoside Rg1, G-Rg1) 是人参皂苷中的有效成分之一, 具有抗炎、抗凋亡等药理活性, 已被用于治疗多种神经退行性疾病<sup>[5-6]</sup>。然而在缺血性脑卒中的治疗中 G-Rg1

无法有效地通过血脑屏障(blood-brain barrier, BBB)转运, 限制了它在临床上的应用<sup>[7]</sup>。骨髓间充质干细胞(bone marrow mesenchymal stem cell, BMSC)衍生的外泌体(exosome, Exo)可作为载体使 G-Rg1 通过 BBB<sup>[8-9]</sup>, 且 BMSC-Exos 含有血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)、转化生长因子等细胞因子<sup>[10-11]</sup>, 卒中后使用可以增强血管生成、神经突重塑和神经发生, 改善功能恢复<sup>[12]</sup>。所以 MSC-Exos 不仅可以作为 G-Rg1 穿透 BBB 的载体, 还可以作为治疗性物质与 G-Rg1 协同作用于缺血组织从而增强其治疗效果。有研究报道, 将 c(RGDyK)肽修饰在 BMSC 衍生的 Exo 表面, 可以提高其靶向性<sup>[13]</sup>。

在本项研究中, 我们将 G-Rg1 负载于 MSC-Exos 中, 为了增强其靶向效果, 在 Exo 表面修饰了 c(RGDyK)肽, 从而实现主动靶向。探究 cRGD-Exo-Rg1 是否能通过激活 PI3K/AKT

通路促进血管生成和神经生成,改善神经功能从而达到治疗缺血性脑卒中的效果。

## 1 材料与方 法

### 1.1 药 物 与 试 剂

G-Rg1, 大连美伦生物技术有限公司; c(RGDyk)肽, 南京肽业生物技术有限公司; 培养细胞的试剂, Gibco 公司; 伊文思蓝(evans blue, EB), Sigma-Aldrich 公司; Cy5.5-azide 和 DBCO-NHS ester, MedChemExpress 公司; AKT (1:500)、P-AKT (1:500)、VEGF (1:500)、PI3K (1:500)、HIF-1 $\alpha$  (1:500)、occludin (1:1 000)和 claudin-5 (1:1 000), 沈阳万类生物科技有限公司。

### 1.2 仪 器

全自动酶标仪, Bio-Rad 公司; UV-2450 紫外-可见分光光度仪, 日立岛津公司; 磁力搅拌器, 常州市凯航仪器有限公司。

### 1.3 实 验 动 物

SD 雄性大鼠年龄(7-8 周), 来自锦州医科大学动物中心。经锦州医科大学动物实验伦理委员会批准(编号: 2021031), 动物许可证号 SYXK [辽] 2019-0007, 饲养环境参考国际动物委员会相关规定饲养: 温度 20-25  $^{\circ}\text{C}$ , 相对湿度为 40%-70%。

### 1.4 方 法

#### 1.4.1 大 鼠 短 暂 性 大 脑 中 动 脉 缺 血 性 模 型 建 立 与 动 物 分 组

雄性 SD 大鼠(250-300 g)用 2%异氟醚麻醉。采用线栓法建立短暂性大脑中动脉缺血性模型: 为阻断同侧大脑半球的血流, 将线栓插入右侧颈内动脉, 阻断右侧大脑中动脉。在大鼠动脉闭塞 2 h 后, 小心拔出线栓恢复再灌注<sup>[14]</sup>。造模成功的标准为: 大鼠清醒后出现同侧 Horner 综合征(梗塞灶同侧瞳孔缩小, 眼裂变小, 眼球内陷)、向对侧转圈爬行、提尾向对侧

旋转、提尾倒立时对侧前肢屈曲者为造模成功, 造模成功率为 90%。实验动物均在麻醉条件下进行所有手术, 并尽一切努力最大限度地减少其疼痛、痛苦和死亡。

50 只 SD 大鼠留取两只单独用做 cRGD-Exo-Rg1 的靶向性实验, 其余 48 只随机分为 sham、tMCAO、Exo、游离 G-Rg1、Exo-Rg1 和 cRGD-Exo-Rg1 组。每组 8 只, 除 sham 组外其他组均为 tMCAO 模型。tMCAO 造模成功后通过尾静脉分别注射 1 mL PBS、Exo、游离 G-Rg1、Exo-Rg1 和 cRGD-Exo-Rg1, 剂量为 1 mg/kg 体重。

#### 1.4.2 细 胞 培 养

BMSC 购于中国科学院上海细胞生物学研究所, 在 DMEM 培养基中培养。将培养皿放置在温度 37  $^{\circ}\text{C}$ 、湿度 95%、CO<sub>2</sub> 浓度为 5%的培养箱中, 每天更换培养基。

#### 1.4.3 外 泌 体 的 分 离 与 鉴 定

收集间充质干细胞的培养基在 15 000 r/min 连续超速离心 30 min, 50 000 r/min 连续超速离心 2.5 h。分离的 Exo 用 PBS 洗涤 1 次, 以进一步鉴定。通过 Western blotting 和透射电镜(transmission electron microscope, TEM)鉴定 Exo。

#### 1.4.4 cRGD 肽修饰外泌体的制备和 G-Rg1 的 装 载

将 PBS 中的 1 mg/mL Exo 与 3  $\mu\text{mol/L}$  DBCO-NHS ester 在磁力搅拌器上于室温搅拌 4 h 后, 使用 100 kDa 的超滤管将混合物洗涤 3 次, 以除去未结合的 DBCO-NHS ester。将具有叠氮化物的 0.3  $\mu\text{mol/L}$  c(RGDyK)肽添加到结合 DBCO 的 Exo 中, 再添加 0.3  $\mu\text{mol/L}$  Cy5.5。反应在磁力搅拌器上于 4  $^{\circ}\text{C}$  进行 12 h 后, 50 000 r/min 离心 90 min, 以除去未结合的配体。用 PBS 洗涤后, 将修饰的 Exo 重悬并储存<sup>[15]</sup>。接下来, 将 cRGD-Exo (1 mg/mL)与 G-Rg1 (1 mg)

共同在 4 °C 孵育 24 h 后, 进行超声处理, 最后得到 cRGD-Exo-Rg1。并且采用紫外分光光度法测得 G-Rg1 包封率为 30%±4%。

#### 1.4.5 TTC 染色与神经功能评价

麻醉大鼠后, 将预冷的 PBS 溶液经心脏灌流, 灌流成功后取出脑子放入模具中, 切成 2 mm 冠状切片, 将其在 2% TTC 中避光浸泡 20 min。染色结束后取出脑片, 梗死组织染色为白色, 正常脑组织染色为红色<sup>[16]</sup>。使用神经系统严重程度评分(Zea-Longa 的 5 分法和 Ludmila Belayev 的 12 分法)来评估神经功能。

#### 1.4.6 免疫荧光

制备脑组织冰冻切片, 并用一级抗体 CD31 (1:50)、NeuN (1:100)和荧光二级抗体处理<sup>[17]</sup>。使用荧光显微镜对免疫荧光染色进行成像观察。

#### 1.4.7 Western blotting 实验

静脉给药 24 h 后, 将预冷的 PBS 溶液经心脏灌流, 灌流成功后取出脑子放入模具中, 从距离大脑千叶顶端 1 mm 开始, 切出 1 mm 厚度的冠状切片, 并将切片分为缺血侧和非缺血侧, 组织放入到 1.5 mL 离心管中备用。剪碎组织并在冰上用 RIPA 强裂解液裂解。裂解完成后在 4 °C、12 000 r/min 离心 30 min 后, 收集上清液制样进行 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳<sup>[18]</sup>。随后将样品转移到聚偏二氟乙烯膜(微孔)上, 并与一级抗体 AKT (1:500)、P-AKT (1:500)、VEGF (1:500)、PI3K (1:500)和 HIF-1 $\alpha$  (1:500)孵育, 4 °C 孵育过夜, 洗膜后与二级抗体孵育, 通过发光显影液观察信号。采用 ImageJ 软件进行密度分析。

#### 1.4.8 cRGD-Exo-Rg1 在缺血脑组织中的分布

为了观察 cRGD-Exo-Rg1 在脑中的分布, 采用 4  $\mu$ L 的 PKH26 标记 cRGD-Exo-Rg1 (1 mg/mL) 经尾静脉注射给 SD 大鼠。给药 3 h 后, 麻醉大鼠并用 PBS 灌注心脏清除血液, 再用 4%的多

聚甲醛缓慢灌流, 取出脑组织沉糖固定一周后, 使用冰冻切片机在 -20 °C 切脑片, 冷冻切片厚度为 20  $\mu$ m。最后用 CD31 抗体对脑血管内皮细胞进行染色, 在荧光显微镜下对缺血区和非缺血区的分布进行成像。

#### 1.4.9 体内血脑屏障通透性的测定

为了研究 cRGD-Exo-Rg1 是否能够改善缺血后 BBB 的通透性, 采用 EB 外渗评估 BBB 的通透性。在缺血 2 h 后给药, 取材前 2 h 尾静脉注射 EB 3 mg/kg, 麻醉大鼠并用 PBS 灌流清除血液后, 取出大脑, 然后切割成 1 mm 冠状切片。通过测定缺血半球组织中 EB 含量评估 BBB 的破坏程度。将缺血半球组织称重并在 50%三氯乙酸中匀质。用乙醇稀释上清液, 用荧光酶标仪测定荧光强度。计算各组脑组织染色含量, 以评价 EB 渗漏情况, 对 EB 渗入到缺血大脑进行量化<sup>[19]</sup>。我们还研究了 cRGD-Exo-Rg1 是否能改变缺血后微血管中紧密连接蛋白的水平。从卒中后大鼠的脑中分离出脑微血管<sup>[20-21]</sup>, 并通过 Western blotting 测定分离的脑微血管中的 occludin (1:1 000)和 claudin-5 (1:1 000)的表达水平。

### 1.5 统计学分析

所有数据均以  $\bar{x} \pm s$  表示。采用单因素方差分析来比较两组间的差异。差异表达为  $P < 0.05$ 。所有的统计学分析均采用 SPSS 23.0 进行。

## 2 结果与分析

### 2.1 cRGD-Exo-Rg1 的修饰与表征

分析 Exo 表面标记物的 Western blotting 实验结果, 通过离心培养基分离收集 Exo, 选择不含 Exo 的残留上清作为阴性对照。结果见图 1A, Exo 的特征标记蛋白 Alix 呈阳性, 另外 Calnexin 作为细胞内质网标记物呈阴性。为验证 c(RGDyK)肽是否与 Exo 成功连接, 采用 Cy5.5

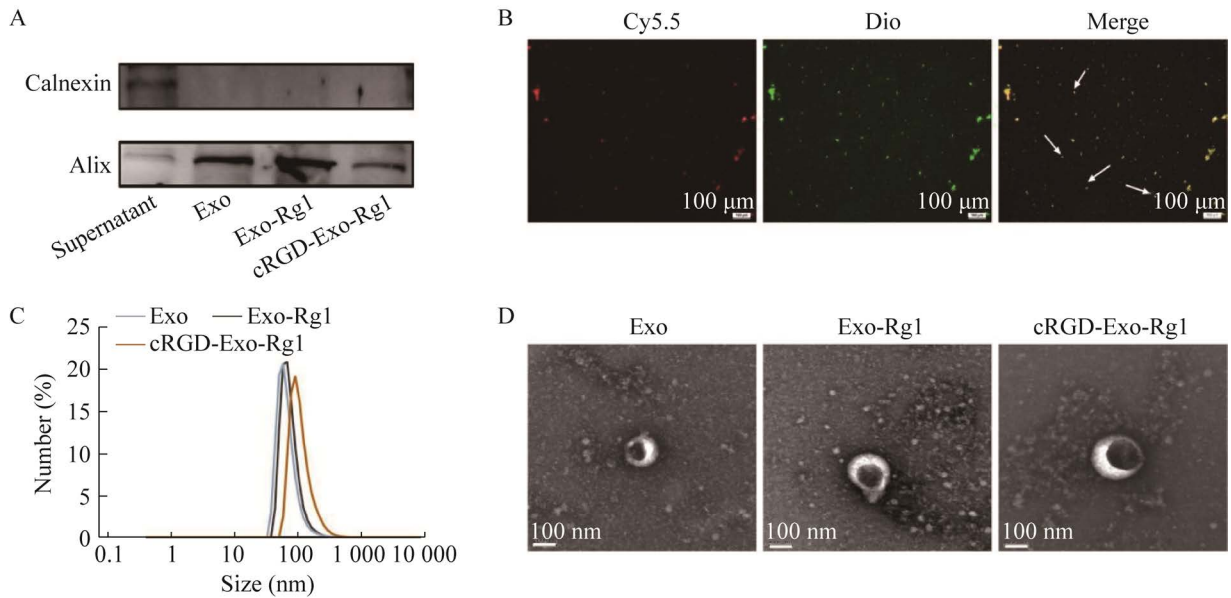


图 1 cRGD-Exo-Rg1 的表征

Figure 1 Characterization of cRGD-Exo-Rg1. A: Western blotting analysis of Exo surface markers. B: Fluorescence image of modified exosomes. C: Particle size distribution of Exo, Exo-Rg1, cRGD-Exo-Rg1. D: Morphology of Exo, Exo-Rg1, cRGD-Exo-Rg1 observed by TEM. The scale bar is 100  $\mu\text{m}$  for (B).

(红色)标记为 c(RGDyK)肽, Dio (绿色)标记为 Exo, 荧光图显示 c(RGDyK)肽与 Exo 成功结合 (图 1B)。通过 Zetasizer Nano ZS 测量 Exo、Exo-Rg1 和 cRGD-Exo-Rg1 的粒径分布。结果见图 1C, 它们的粒径分布在 60–120 nm 之间。Exo、Exo-Rg1 和 cRGD-Exo-Rg1 的透射电镜图 (图 1D)均显示 Exo 经典的“杯口”形态。这些结果表明, c(RGDyK)与 Exo 的结合和 G-Rg1 的装载不会改变 Exo 的基本特性。

### 2.2 cRGD-Exo-Rg1 提高了在缺血区域的靶向递送

为检测 cRGD-Exo-Rg1 在缺血区域的分布, 在大鼠缺血 2 h 后尾静脉注射 PKH26 标记的 cRGD-Exo-Rg1, 3 h 后取脑组织沉糖固定。免疫荧光的结果表明与正常侧相比, cRGD-Exo-Rg1 主要积聚在脑缺血侧, 证实 cRGD-Exo-Rg1 可以穿过 BBB 并有效迁移到缺血脑中。这是由

于在脑缺血区  $\alpha\text{v}\beta3$  高度表达, cRGD-Exo-Rg1 表面的 c(RGDyK)肽可以与  $\alpha\text{v}\beta3$  相结合, 从而导致脑缺血侧累积的 cRGD-Exo-Rg1 更多。为了进一步追踪 cRGD-Exo-Rg1 在缺血区的细胞内分布, 用内皮细胞特异性标记物 CD31 进行染色, cRGD-Exo-Rg1 与缺血区域的 CD31 共定位良好 (图 2)。结果表明 cRGD-Exo-Rg1 可以靶向脑缺血后的内皮细胞, 影响血管生成。

### 2.3 cRGD-Exo-Rg1 通过 PI3K/AKT 通路促进血管生成和神经生成治疗缺血性脑卒中

PI3K/Akt 通路影响多种细胞功能, 例如细胞存活、增殖、分化和迁移, 因此 PI3K/Akt 通路在血管生成和神经生成的调节中至关重要。VEGF 是一种血管生成和血管通透性因子, 在脑缺血的血管反应中起重要作用。最近的研究表明, VEGF 也可能是一种直接的神经发生和神经保护因子。缺氧诱导因子(hypoxia-inducible

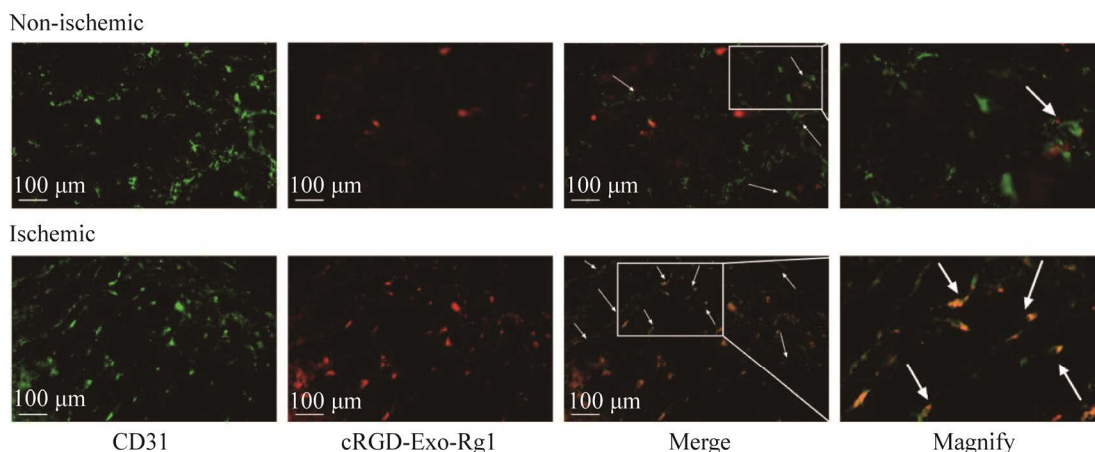


图2 接受 cRGD-Exo-Rg1 治疗的 tMCAO 大鼠大脑的代表性荧光图像

Figure 2 Representative fluorescent images of brains from tMCAO rats receiving cRGD-Exo-Rg1. Co-location of PKH26 labeled cRGD-Exo-Rg1 (red) with CD31 (green) in brain tissue. The scale bar is 100  $\mu\text{m}$ .

factors, HIF-1 $\alpha$ )控制参与能量代谢、血管生成、凋亡、增殖、细胞迁移和分化等过程的各种基因的转录,该因子与组织缺氧/缺血后的新生血管形成有关。为验证 cRGD-Exo-Rg1 是否通过 PI3K/AKT 信号通路促进血管生成和神经生成并上调 VEGF 与 HIF-1 $\alpha$  的表达,我们提取了缺血半影区的组织做了 Western blotting 实验, cRGD-Exo-Rg1 激活 PI3K 和 AKT 磷酸化途径, VEGF 与 HIF-1 $\alpha$  的表达水平也明显高于 tMCAO 组和其余治疗组(图 3A、3B)。

脑血管的保护和再生对脑梗死的恢复至关重要。采用免疫荧光法检测脑梗死组织中微血管和神经元的分布。与对照组相比, tMCAO 组大鼠血管形态有明显断裂, cRGD-Exo-Rg1 组大鼠相较其他治疗组血管形态改善更为明显,同时微血管密度的增加都证明 cRGD-Exo-Rg1 在血管生成方面具有良好的促进效果(图 3C)。采用同样的方法使用 NeuN 标记神经元细胞,与 CD31 染色结果一致。cRGD-Exo-Rg1 治疗组神经元的数量明显高于其余治疗组(图 3D),表明 cRGD-Exo-Rg1 治疗可促进卒中后的神经生成。

#### 2.4 cRGD-Exo-Rg1 能有效改善神经功能恢复,减少梗死体积

由于 cRGD-Exo-Rg1 显示出可通过激活 PI3K/AKT 通路促进血管生成和神经生成,通过评估 tMCAO 模型中的梗死体积百分比和神经功能评分,进一步研究了 cRGD-Exo-Rg1 能否有效改善神经功能。将 tMCAO 大鼠的大脑进行 TTC 染色,计算脑梗塞体积。结果见图 4A、4B, tMCAO 组在皮层和纹状体均出现明显梗死,梗死体积为 73% $\pm$ 9%。Exo、Rg1、Exo-Rg1 和 cRGD-Exo-Rg1 治疗组的梗死体积分别为 55% $\pm$ 6%、67% $\pm$ 4%、38% $\pm$ 4%和 31% $\pm$ 5%。与 PBS 处理的 tMCAO 组相比,治疗组的脑梗塞体积均有所减少,但游离的 G-Rg1 治疗效果不明显,没有统计学差异。cRGD-Exo-Rg1 脑梗死体积最小,治疗效果更好。另外对每组大鼠进行 Zea-Longa 和 Ludmila Belayev 评分,以评估 tMCAO 大鼠的神经功能改善程度。其结果与 TTC 染色结果一致。与其他组相比, cRGD-Exo-Rg1 治疗组的 Zea-Longa 和 Ludmila Belayev 评分均显著降低,改善了神经功能(图 4C、4D)。

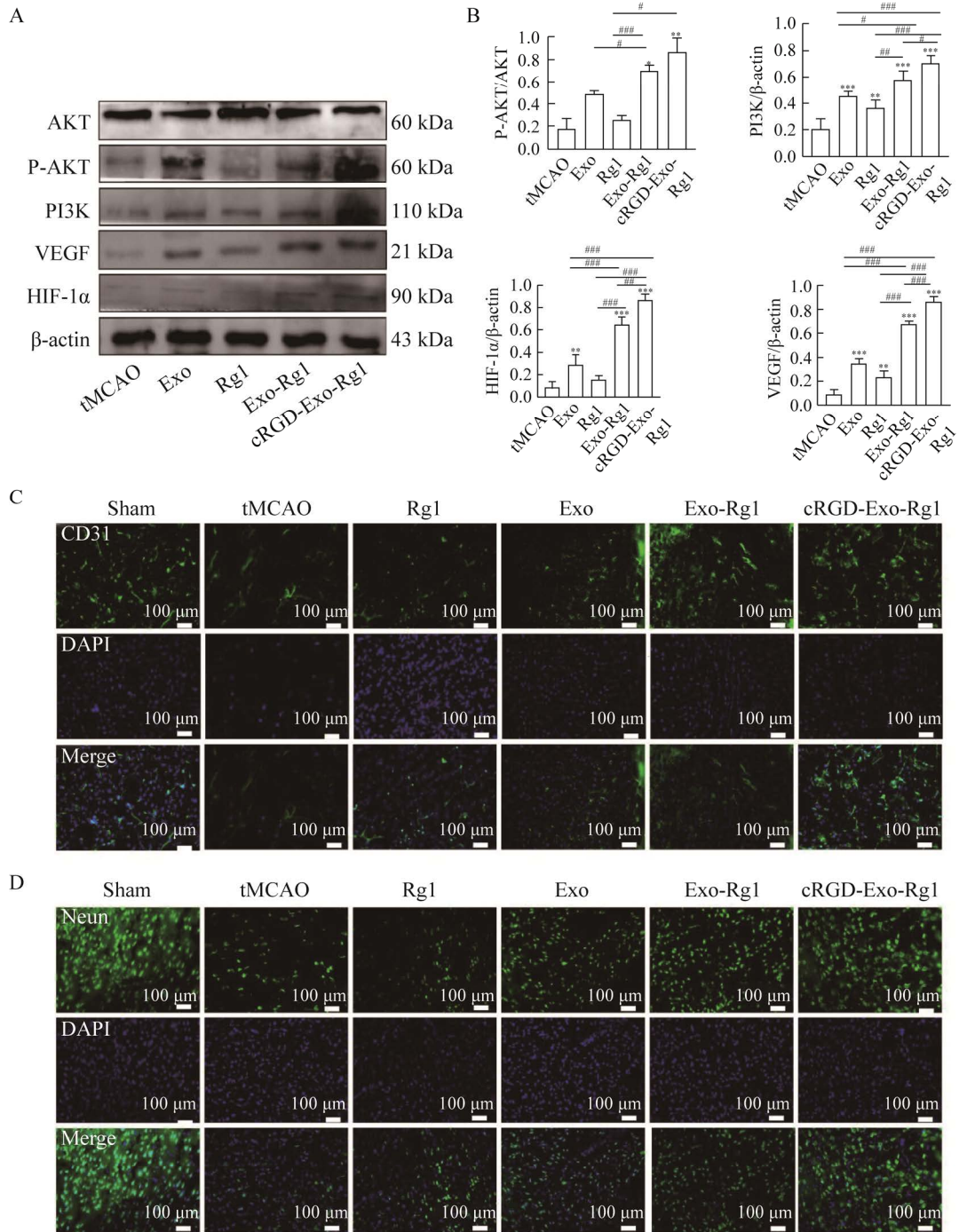


图3 cRGD-Exo-Rg1 促进血管生成和神经生成

Figure 3 cRGD-Exo-Rg1 promotes angiogenesis and neurogenesis. A, B: Western blotting and analysis of the expression levels of AKT, P-AKT, VEGF, PI3K, HIF-1 $\alpha$  in ischemia/reperfusion brain tissue. Data are expressed as  $\bar{x} \pm s$  ( $n=3$ ). Comparing score on tMCAO model, \*:  $P<0.05$ ; \*\*:  $P<0.01$ ; \*\*\*:  $P<0.001$ ; #:  $P<0.05$ ; ##:  $P<0.01$ ; ###:  $P<0.001$ . C: CD31 fluorescence imaging of brain tissue in each group. CD31 antibodies (green) was used to stain endothelial cells. DAPI (blue) was used as a nuclear marker. D: NeuN fluorescence imaging of brain tissue in each group. NeuN antibody (green) was used to stain neurons. The scale bar is 100  $\mu$ m for (C) and (D).

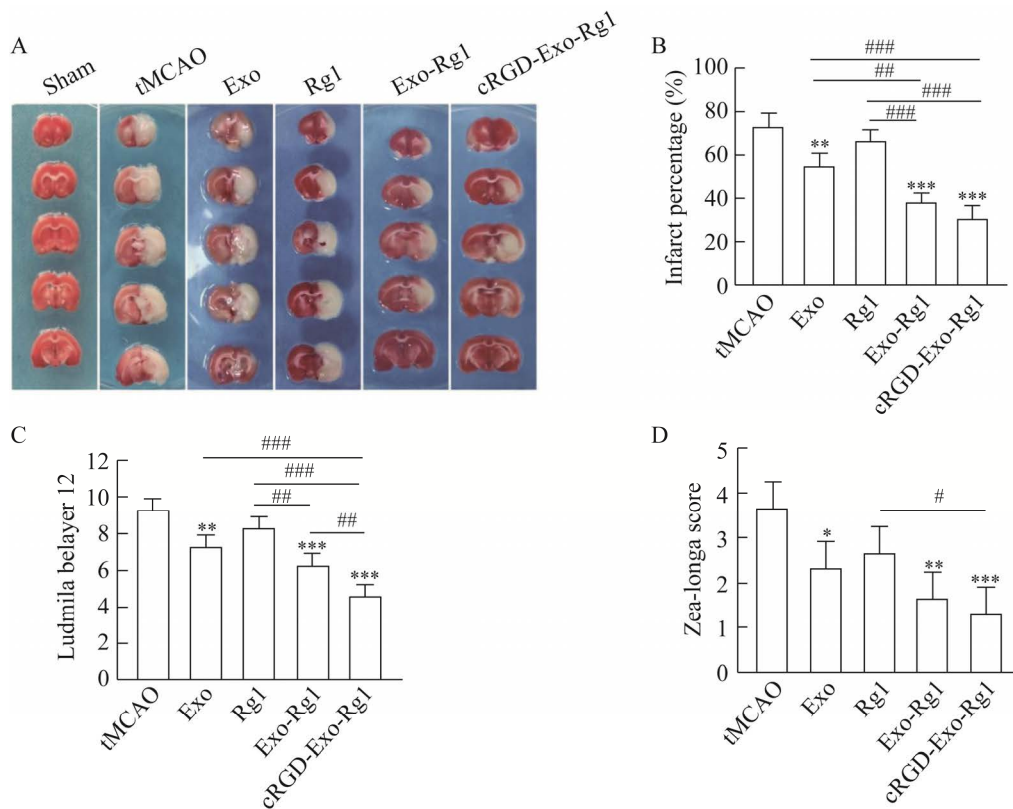


图 4 cRGD-Exo-Rg1 可有效改善神经系统恢复

Figure 4 cRGD-Exo-Rg1 can effectively improve neurological recovery. A: TTC staining images of brain slices in each group. B: Statistics of brain infarction rate in each group. Data are expressed as  $\bar{x} \pm s$  ( $n=3$ ). Comparing with infarct volume on tMCAO model, \*:  $P<0.05$ ; \*\*:  $P<0.01$ ; \*\*\*:  $P<0.001$ ; #:  $P<0.05$ ; ##:  $P<0.01$ ; ###:  $P<0.001$ . C: Ludmila Belayev neurological scores. D: Zea-Longa neurological score.

## 2.5 cRGD-Exo-Rg1 可以保护缺血后血脑屏障的完整性

为了确定 cRGD-Exo-Rg1 能否调节缺血再灌注损伤后 BBB 的完整性和通透性, 使用 EB 渗透实验评估了 cRGD-Exo-Rg1 对 BBB 的影响。结果见图 5A、5B, tMCAO 组内纹状体部位至皮质有明显的 EB 浸润, 表明 BBB 完整性严重受损, 通透性明显增强, tMCAO 组的 EB 渗透率为  $77\% \pm 16\%$ 。Rg1、Exo、Exo-Rg1 和 cRGD-Exo-Rg1 的渗透率分别为  $62\% \pm 13\%$ 、 $49\% \pm 6\%$ 、 $37\% \pm 15\%$  和  $22\% \pm 6\%$ 。与其他组相比, cRGD-Exo-Rg1 治疗组的 EB 外渗显著减少, 维持了 BBB 的完整性。脑内的血管内皮细胞之

间通过各种紧密连接蛋白相连, 是维持 BBB 完整性的重要因素之一。特别是紧密蛋白 occludin 和 claudin-5 可以代表 BBB 的通透性状态, 它们的下降程度反映了 BBB 的损伤程度。我们采用 Western blotting 实验检测微血管中 occludin 和 claudin-5 的表达水平。与 sham 组相比, tMCAO 组中的 occludin 和 claudin-5 表达显著降低(图 5C、5D)。表明缺血性脑卒中发生时, 紧密连接蛋白解体, BBB 完整性严重受损。而经过 cRGD-Exo-Rg1 治疗后, 微血管中 occludin 和 claudin-5 的表达显著增加。总之, cRGD-Exo-Rg1 可通过上调 occludin 和 claudin-5 的表达保护 BBB 完整性, 防止缺血再灌注诱导的损伤。



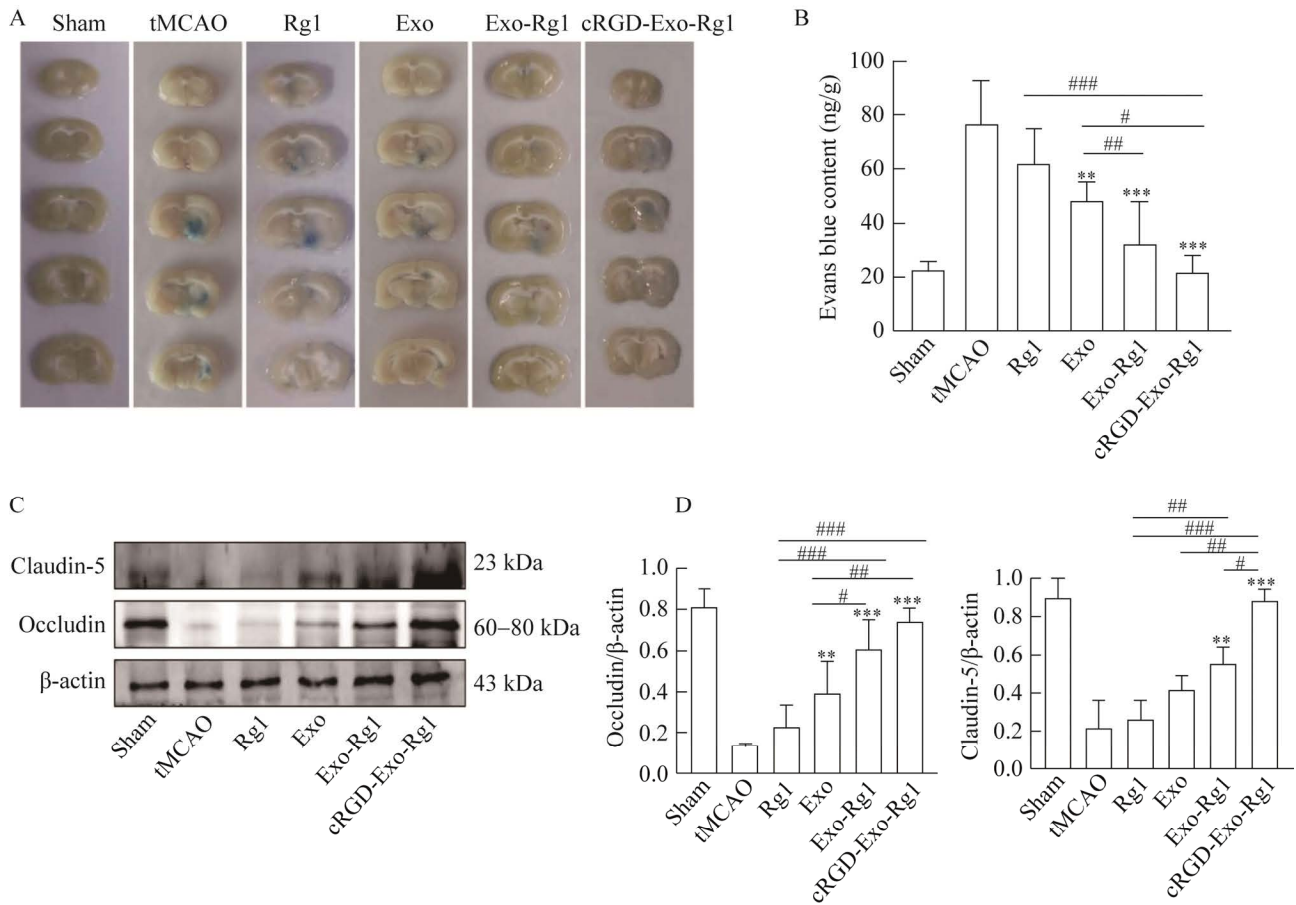


图 5 cRGD-Exo-Rg1 保护缺血后血脑屏障的完整性

Figure 5 cRGD-Exo-Rg1 protects the integrity of the BBB after ischemia. A: EB extravasation was measured to evaluate BBB permeability. B: Quantification analysis of extravasated EB (ng/g). Data are expressed as  $\bar{x} \pm s$  ( $n=3$ ), Comparing score on tMCAO model, \*:  $P<0.05$ ; \*\*:  $P<0.01$ ; \*\*\*:  $P<0.001$ ; #:  $P<0.05$ ; ##:  $P<0.01$ ; ###:  $P<0.001$ . C, D: Analysis of occludin and claudin-5 protein levels.

### 3 讨论与结论

由脑动脉闭塞引起的缺血性脑卒中会显著减少局部脑血流量，从而导致细胞死亡、脑萎缩和功能缺陷。所以恢复缺血性脑组织中的局部血液灌注在组织修复和功能恢复中起着关键作用<sup>[22-23]</sup>。越来越多的证据表明，血管生成涉及神经功能恢复，并能改善脑微循环灌注和减少梗死体积<sup>[24-25]</sup>。

本研究通过往 tMCAO 大鼠尾静脉注射 PKH26 标记的 cRGD-Exo-Rg1，检测药物在大

脑中的分布，结果显示，与非缺血区域相比，缺血区域的 cRGD-Exo-Rg1 积聚增强，表明 cRGD-Exo-Rg1 可穿透 BBB 并在缺血脑组织中特异性积聚。TTC 与神经功能学评分的结果表明，与游离的 G-Rg1 相比，cRGD-Exo-Rg1 表现出更少的脑梗死体积、呈现较低的神经评分，证明 cRGD-Exo-Rg1 在 tMCAO 模型大鼠中表现出显著的神经功能恢复。通过免疫荧光染色与 Western blotting 实验证实，cRGD-Exo-Rg1 可通过激活 PI3K/AKT 通路上调 VEGF 和 HIF-1 $\alpha$  的表达促进血管生成和神经生成。EB 渗透实验

证实 cRGD-Exo-Rg1 进入脑内后可有效保护 BBB 的完整性。尽管研究表明 cRGD-Exo-Rg1 有助于减少 tMCAO 动物模型的缺血性损伤, 但只是研究了短期内 cRGD-Exo-Rg1 的治疗作用, 在缺血再灌注恢复期的作用效果还未来得及深入研究。在未来, 将探究 cRGD-Exo-Rg1 在短暂性脑缺血再灌注恢复期的影响及其潜在作用机制。

本研究成功制备了 cRGD-Exo-Rg1 并将其作为一种新型脑靶向药物, 增强了 G-Rg1 在大鼠 tMCAO 模型中的治疗效果。cRGD-Exo-Rg1 能有效特异地进入到大鼠缺血脑内, 通过激活 PI3K/AKT 通路促进血管生成和神经生成。结果表明, cRGD-Exo-Rg1 可作为一种新的治疗缺血性脑卒中的策略, 并为其他神经保护治疗方式的潜在临床益处提供实验依据。

## REFERENCES

- [1] NOZOHOORI S, SIFAT AE, VAIDYA B, ABBRUSCATO TJ. Novel approaches for the delivery of therapeutics in ischemic stroke[J]. *Drug Discovery Today*, 2020, 25(3): 535-551.
- [2] LI YC, ZHONG W, JIANG Z, TANG XQ. New progress in the approaches for blood-brain barrier protection in acute ischemic stroke[J]. *Brain Research Bulletin*, 2019, 144: 46-57.
- [3] ZHANG ZG, CHOPP M. Promoting brain remodeling to aid in stroke recovery[J]. *Trends in Molecular Medicine*, 2015, 21(9): 543-548.
- [4] XIE JB, SHEN ZY, ANRAKU Y, KATAOKA K, CHEN XY. Nanomaterial-based blood-brain-barrier (BBB) crossing strategies[J]. *Biomaterials*, 2019, 224: 119491.
- [5] XIE WJ, ZHOU P, SUN YF, MENG XB, DAI ZR, SUN GB, SUN XB. Protective effects and target network analysis of ginsenoside Rg1 in cerebral ischemia and reperfusion injury: a comprehensive overview of experimental studies[J]. *Cells*, 2018, 7(12): 270.
- [6] ZHONG JC, LU WJ, ZHANG JY, HUANG MH, LYU WY, YE GN, DENG LJ, CHEN MF, YAO N, LI Y, LIU GP, LIANG YF, FU JW, ZHANG DM, YE WC. Notoginsenoside R1 activates the Ang2/Tie2 pathway to promote angiogenesis[J]. *Phytomedicine*, 2020, 78: 153302.
- [7] GU YQ, REN KW, WANG LM, JIANG CZ, YAO QQ. Rg1 in combination with mannitol protects neurons against glutamate-induced ER stress via the PERK-eIF2  $\alpha$ -ATF4 signaling pathway[J]. *Life Sciences*, 2020, 263: 118559.
- [8] KIM HY, KIM TJ, KANG LM, KIM YJ, KANG MK, KIM J, RYU JH, HYEON T, YOON BW, KO SB, KIM BS. Mesenchymal stem cell-derived magnetic extracellular nanovesicles for targeting and treatment of ischemic stroke[J]. *Biomaterials*, 2020, 243: 119942.
- [9] RAHMANI A, SALEKI K, JAVANMEHR N, KHODAPARAST J, SAADAT P, NOURI HR. Mesenchymal stem cell-derived extracellular vesicle-based therapies protect against coupled degeneration of the central nervous and vascular systems in stroke[J]. *Ageing Research Reviews*, 2020, 62: 101106.
- [10] YEO RWY, LAI RC, ZHANG B, TAN SS, YIN YJ, TEH BJ, LIM SK. Mesenchymal stem cell: an efficient mass producer of exosomes for drug delivery[J]. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2013, 65(3): 336-341.
- [11] BRONCKAERS A, HILKENS P, MARTENS W, GERVOIS P, RATAJCZAK J, STRUYS T, LAMBRICHTS I. Mesenchymal stem/stromal cells as a pharmacological and therapeutic approach to accelerate angiogenesis[J]. *Pharmacology & Therapeutics*, 2014, 143(2): 181-196.
- [12] COUMANS FAW, BRISSON AR, BUZAS EI, DIGNAT-GEORGE F, DREES EEE, EL-ANDALOUSSI S, EMANUELI C, GASECKA A, HENDRIX A, HILL AF, LACROIX R, LEE Y, van LEEUWEN TG, MACKMAN N, MÄGER I, NOLAN JP, van der POL E, PEGTEL DM, SAHOO S, SILJANDER PRM, et al. Methodological guidelines to study extracellular vesicles[J]. *Circulation Research*, 2017, 120(10): 1632-1648.
- [13] TIAN T, ZHANG HX, HE CP, FAN S, ZHU YL, QI C, HUANG NP, XIAO ZD, LU ZH, TANNOUS BA, GAO J. Surface functionalized exosomes as targeted drug delivery vehicles for cerebral ischemia therapy[J]. *Biomaterials*, 2018, 150: 137-149.
- [14] GUO L, PAN JL, LI F, ZHAO L, SHI YJ. A novel brain targeted plasma exosomes enhance the neuroprotective efficacy of edaravone in ischemic stroke[J]. *IET*

- Nanobiotechnology, 2021, 15(1): 107-116.
- [15] ZHANG HX, WU J, WU JH, FAN Q, ZHOU JC, WU JW, LIU SC, ZANG J, YE JH, XIAO M, TIAN T, GAO J. Exosome-mediated targeted delivery of miR-210 for angiogenic therapy after cerebral ischemia in mice[J]. *Journal of Nanobiotechnology*, 2019, 17(1): 29.
- [16] HUANG ZX, GUO L, HUANG LJ, SHI YJ, LIANG J, ZHAO L. Baicalin-loaded macrophage-derived exosomes ameliorate ischemic brain injury via the antioxidative pathway[J]. *Materials Science and Engineering: C*, 2021, 126: 112123.
- [17] LI F, ZHAO L, SHI YJ, LIANG J. Edaravone-loaded macrophage-derived exosomes enhance neuroprotection in the rat permanent middle cerebral artery occlusion model of stroke[J]. *Molecular Pharmaceutics*, 2020, 17(9): 3192-3201.
- [18] JIANG YB, HE RY, SHI YJ, LIANG J, ZHAO L. Plasma exosomes protect against cerebral ischemia/reperfusion injury via exosomal HSP70 mediated suppression of ROS[J]. *Life Sciences*, 2020, 256: 117987.
- [19] HE RY, JIANG YB, SHI YJ, LIANG J, ZHAO L. Curcumin-laden exosomes target ischemic brain tissue and alleviate cerebral ischemia-reperfusion injury by inhibiting ROS-mediated mitochondrial apoptosis[J]. *Materials Science and Engineering: C*, 2020, 117: 111314.
- [20] LIU WL, SOOD R, CHEN QC, SAKOGLU U, HENDREN J, CETIN O, MIYAKE M, LIU KJ. Normobaric hyperoxia inhibits NADPH oxidase-mediated matrix metalloproteinase-9 induction in cerebral microvessels in experimental stroke[J]. *Journal of Neurochemistry*, 2008, 107(5): 1196-1205.
- [21] BRZICA H, ABDULLAHI W, REILLY BG, RONALDSON PT. A simple and reproducible method to prepare membrane samples from freshly isolated rat brain microvessels[J]. *Journal of Visualized Experiments: JoVE*, 2018(135): 57698.
- [22] WILLIAMSON MR, FRANZEN RL, FUERTES CJA, DUNN AK, DREW MR, JONES TA. A window of vascular plasticity coupled to behavioral recovery after stroke[J]. *Journal of Neuroscience*, 2020, 40(40): 7651-7667.
- [23] ARAI K, JIN G, NAVARATNA D, LO EH. Brain angiogenesis in developmental and pathological processes: neurovascular injury and angiogenic recovery after stroke[J]. *The FEBS Journal*, 2009, 276(17): 4644-4652.
- [24] YUE PYK, WONG DYK, HA WY, FUNG MC, MAK NK, YEUNG HW, LEUNG HW, CHAN K, LIU L, FAN TPD, WONG RNS. Elucidation of the mechanisms underlying the angiogenic effects of ginsenoside Rg<sub>1</sub>[J]. *Angiogenesis*, 2005, 8(3): 205-216.
- [25] BECK H, PLATE KH. Angiogenesis after cerebral ischemia[J]. *Acta Neuropathologica*, 2009, 117(5): 481-496.

(本文责编 陈宏宇)