

齐墩果酸与白桦脂酸共组装纳米体系构建及其对LPS诱导急性肺损伤的保护作用研究

张娟, 张玲, 王嘉成*, 李国才*

(扬州大学医学院(转化医学研究院), 江苏省中西医结合老年病防治重点实验室, 江苏扬州 225001)

摘要: 齐墩果酸(Oleanolic Acid, OA)和白桦脂酸(Betulinic acid, BA)是多种水果、蔬菜中的生物活性物质。该研究以OA和BA为原料,通过超分子组装策略制备了一种纯天然OA-BA纳米颗粒(Nanoparticles, NPs)。表征了OA-BA NPs的微观形貌、亲疏水性、粒径分布、缓释释放等特性;分析了OA-BA NPs对脂多糖(Lipopolysaccharide, LPS)诱导RAW264.7细胞炎症反应的保护作用;探究了其LPS诱导ICR小鼠急性肺损伤的保护作用。结果表明,OA-BA NPs呈镰形结构,水接触角为 36.6° ,亲水性直径约360 nm, pH值7.4介质中48 h累计释放量约总质量的80%。体外实验表明,OA-BA NPs处理后TNF- α 和IL-6表达水平明显降低,IL-10水平显著提升。尾静脉注射OA-BA NPs可有效减少LPS诱导小鼠的急性肺损伤,与模型组相比,OA-BA NPs治疗组中肺组织p-PI3K、p-PDK1、p-AKT、p-GSK-3 β 蛋白表达水平明显降低。结论,OA-BA NPs有良好的分散性、稳定性、缓释释放性,可调节LPS诱导的炎症因子释放,有效改善LPS诱导的肺部炎症损伤,其机制可能与激活PI3K/AKT/GSK-3 β 信号通路有关。该纳米制剂的成功构建可为脓毒症诱导炎症损伤的早期临床救治提供全新思路。

关键词: 齐墩果酸; 白桦脂酸; 超分子组装; 肺损伤; PI3K/AKT/GSK-3 β 信号通路

文章编号: 1673-9078(2025)05-1-9

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2025.5.0384

Construction of Co-assembled Oleanolic Acid-betulinic Acid Nanoparticles and Clarification of Their Protective Effect on LPS-induced Acute Lung Injury

ZHANG Juan, ZHANG Ling, WANG Jiacheng*, LI Guocai*

(Institute of Translational Medicine, Medical College, Yangzhou University, Jiangsu Key Laboratory of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine for Prevention and Treatment of Senile Diseases, Yangzhou 225001, China)

Abstract: Oleanolic acid (OA) and betulinic acid (BA) are common bioactive substances in various fruits and vegetables. In this study, pure natural OA-BA nanoparticles (NPs) were prepared using OA and BA as raw materials through a supramolecular assembly strategy. The microstructure, hydrophilicity-hydrophobicity balance, particle size distribution,

引文格式:

张娟,张玲,王嘉成,等.齐墩果酸与白桦脂酸共组装纳米体系构建及其对LPS诱导急性肺损伤的保护作用研究[J].现代食品科技,2025,41(5):1-9.

ZHANG Juan, ZHANG Ling, WANG Jiacheng, et al. Construction of co-assembled oleanolic acid-betulinic acid nanoparticles and clarification of their protective effect on LPS-induced acute lung injury [J]. Modern Food Science and Technology, 2025, 41(5): 1-9.

收稿日期: 2024-03-27

基金项目: 国家自然科学基金项目(82373637; 82073611; 82002186; 81471906); 江苏省自然科学基金项目(BK20231241)

作者简介: 张娟(1989-),女,硕士研究生,主管药师,研究方向: 中药制剂, E-mail: juanzhang825@hotmail.com

通讯作者: 李国才(1970-),男,博士,教授,研究方向: 病原细菌耐药, E-mail: gcli@yzu.edu.cn; 王嘉成(1985-),男,博士,讲师,研究方向: 中药纳米制剂, E-mail: jcw@yzu.edu.cn

and sustained release capability of OA-BA NPs were characterized. The protective effect of OA-BA NPs on the inflammatory response induced by lipopolysaccharide (LPS) in RAW264.7 cells was clarified, as well as its protective effect on LPS-induced acute lung injury in ICR mice. The results indicated that OA-BA NPs exhibited a sickle-shaped structure, a water contact angle of 36.6°, a hydrophilic diameter of approximately 360 nm, and an accumulated release of approximately 80% in a pH 7.4 medium over 48 hours. *In vitro* experiments demonstrated that treatment with OA-BA NPs significantly reduced the expression of cytokines TNF- α and IL-6 and significantly increased the expression of IL-10. Tail intravenous injection of OA-BA NPs effectively reduced LPS-induced acute lung injury in mice. Compared with the model group, the expression of p-PI3K, p-PDK1, p-AKT, and p-GSK-3 β proteins in lung tissues of the OA-BA NPs treatment group significantly decreased. In conclusion, OA-BA NPs exhibit favorable dispersion, stability, and sustained release properties. They demonstrate the ability to modulate the LPS-induced release of inflammatory factors and effectively ameliorate LPS-induced inflammatory lung injury. The underlying mechanism is potentially associated with the activation of the PI3K/AKT/GSK-3 β signaling pathway. The successful development of this nanopreparation presents a novel approach for managing sepsis-induced inflammatory injury in early clinical intervention.

Key words: oleanolic acid; betulinic acid; supermolecular assembly; acute lung injury; PI3K/AKT/GSK-3 β signaling pathway

脓毒症是一种由先天免疫反应失调介导的复杂炎症性疾病。每年超过 5 000 万新发病例，死亡率接近 30%^[1-3]。脓毒症治疗极具挑战性，目前没有治疗脓毒症的特异性疗法，需要开发新的治疗方案^[4,5]。脂多糖 (Lipopolysaccharide, LPS)，在脓毒症发病机制中起重要作用^[6]。LPS 可以被免疫细胞识别为病原相关分子模式，通过与先天免疫细胞的相互作用，导致大量炎症介质的释放^[7-9]。过度的全身性炎症反应可导致广泛的器官和组织损伤，最终导致多器官衰竭和死亡^[10]。肺是脓毒症期间受主要影响的器官之一，并且接近 50% 的脓毒症患者发展为急性呼吸窘迫综合征^[11,12]。感染和炎症导致肺泡上皮和内皮的损伤，产生水肿、出血、弥漫性损伤以及中性粒细胞和巨噬细胞的浸润^[13]。受损的肺内皮通过分泌促炎因子，促进白细胞向肺部损伤部位募集加剧炎症反应。因此，LPS 诱导的多器官损伤通过抗炎类药物治疗对炎症缓解更有效。

齐墩果酸 (Oleanolic Acid, OA) 属齐墩果烷型五环三萜类天然小分子化合物，具有多种生物活性，广泛存在多种水果以及药用植物中，具有抗炎、抗氧化、保肝和免疫调节等作用，特别是其抗炎活性在临床上已经被广泛用于辅助治疗各种炎症性肝炎^[14-16]。研究显示，OA 可通过其抗炎，抗氧化应激和抗凋亡作用减轻兴奋性肺损伤^[17]；可通过氧化应激及 AKT/NF- κ B 途径降低二氧化硅诱导的肺损伤和纤维化^[18]；可通过调节炎症因子改善脓毒症肺损伤^[19]。白桦脂酸 (Betulinic Acid, BA) 属羽扇豆烷型五环三萜化合物，具有抗炎、抗氧化等作用，

已被作为一种有效的抗氧化剂被广泛研究^[20,21]。研究表明，BA 可通过其抗氧化活性改善大鼠的氧化性结肠损伤^[22]；BA 可能通过激活 Nrf2 信号通路发挥抗氧化和抗炎作用防止肾损伤^[23]；然而，两种化合物水溶性差，生物利用度低，严重限制了其临床应用^[24]。纳米技术在生物医药领域，用于改善难溶性药物溶解度，提高其生物利用度的特色已被广泛证明，并展现出不凡的应用潜力^[25-27]。

本研究的目的是建立具有生物活性的天然小分子共组装药物递送体系，探索天然无载体纳米制剂的抗炎作用及其潜在作用机制^[28]。由于齐墩果酸与白桦脂酸两种化合物的天然药理活性和预防保健功效，该纳米制剂不仅避免了大量载体赋形剂体内富集带来的系统毒性，同时也消除了人们对化合物的生物可降解性的顾虑。总的来说，利用纯天然化合物构建无载体复合纳米制剂的策略，将为全活性纳米递送系统的制备提供思路。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

白桦脂酸、白桦脂醇，南京春秋生物工程有限公司；甲醇、乙腈、二氯甲烷（色谱纯），国药集团化学试剂有限公司；聚乙烯醇、LPS，美国 Sigma-Aldrich 公司；TNF- α 、IL-6、IL-10 Elisa 试剂盒，欣博盛生物科技有限公司；PI3K 抗体、p-PI3K 抗体、PDK1 抗体、p-PDK1 抗体、AKT 抗体、p-AKT 抗体、GSK-3 β 抗体、p-GSK-3 β 抗体，美国 CST 公司。

1.2 仪器与设备

LC-10N-50 冷冻干燥仪, 上海力辰仪器科技有限公司; 超高速冷冻离心机, 美国 Thermo Fisher Scientific 公司; GeminiSEM 300 蔡司场发射扫描电镜系统, 德国 Carl Zeiss 公司; ES90 Nano 马尔文粒子分析仪, 英国 Malvern 公司; Waters e2695 高效液相色谱仪, 沃特世科技(上海)有限公司; ELX800 酶标仪, 美国伯腾仪器有限公司; 化学发光成像系统, 莫纳生物科技有限公司; 1645050 型电泳仪, 美国伯乐公司。

1.3 方法

1.3.1 纳米粒子制备

纳米粒子(Nanoparticles, NPs)制备方法基于参考文献并进行改进^[29], 称取适量 OA 和 BA 溶于二氯甲烷, 取适量上述溶液连续滴加至含有质量分数 2.5% 的聚乙烯醇(Polyvinyl Alcohol, PVA)水溶液中, 涡旋振荡混匀, 随后置于探头式超声仪下超声, 将所得的混合乳液转入含有质量分数 0.3% 的 PVA 水溶液中, 室温磁力搅拌过夜, 低温冷冻离心分离 NPs, 加水清洗 3 次, 真空冷冻干燥后, 4 °C 保存备用。将 BA 和 OA 二氯甲烷溶液按 1 比 3 体积混合后按上述方法制备 OA-BA NPs。

1.3.2 动态光散射(DLS)测定NPs粒径分布和Zeta电位

将 OA NPs、BA NPs、OA-BA NPs 冻干粉末加适量双蒸水重新分散, 稀释 400~800 倍, 将稀释液转移至样品池, 测定 NPs 粒径分布、多分散指数(Polydispersity Index, PDI)和 Zeta 电位。记录三次平行实验测定结果, 并计算平均值。

1.3.3 NPs微观形貌分析

通过场发射扫描电子显微镜(Scanning Electron Microscope, SEM)观察 NPs 微观形貌。先将导电胶粘贴到样品台, 将样品冻干粉抹粘贴到导电胶上, 用洗耳球去除未黏贴样品, 随后将样品进行镀膜处理增强导电性, 将样品盘转入扫描电子显微镜进行观察。

1.3.4 OA-BA NPs体外释放实验

通过模拟生理环境(pH 值 7.4)和溶酶体环境(pH 值 5.5)评价 OA-BA NPs 体外缓释释放特性。将一定量 OA-BA NPs 冻干粉末分散在 10 mL 缓释介质中, 随后转移至透析袋中。将透析袋分别转至 1 000 mL pH 值 7.4 和 5.5 的磷酸盐缓冲液(Phosphate Buffer Saline, PBS)中, 在 37 °C 下, 机械搅拌 170 r/min

透析。以预定时间间隔, 从透析袋中取出 0.1 mL 样品, 通过高效液相色谱(High Performance Liquid Chromatography, HPLC)测定样品中 OA 和 BA 的质量浓度, 计算释放量。

1.3.5 HPLC检测OA-BA NPs化合物的色谱条件

采用高效液相色谱仪测定 OA-BA NPs 中各组份含量。色谱条件: 安捷伦 C₁₈ 色谱柱, 流动相为乙腈: 体积分数 0.1% 的磷酸水(85:15), 流速为 1.0 mL/min, OA 检测波长为 203 nm, BA 检测波长为 205 nm, 出峰时间定性、峰面积定量。

1.3.6 细胞实验

NPs 的细胞毒性实验。在 96 孔板中每孔接种 5×10^3 个 RAW264.7 细胞, 在 37 °C, 体积分数 5% 的 CO₂ 的条件培养, 待完全贴壁, 加入不同质量浓度的含 NPs 培养基孵育 12 h 后, 向每孔加入 10 μ L CCK-8 溶液, 继续在培养箱孵育 1~4 h, 酶标仪测定吸光度。

抗炎活性评价。在 96 孔板接种 RAW264.7 细胞悬液, 待完全贴壁, 加入 LPS (1 μ g/mL) 并含有不同质量浓度纳米制剂的培养基孵育 12 h 后, 根据酶联免疫吸附测定(ELISA)试剂盒说明书测定细胞上清液中 IL-6 和 TNF- α 和 IL-10 水平。

1.3.7 动物分组与模型建立

SPF 级雄性 ICR 小鼠(7~8 周, 体质量 28~32 g)购自扬州大学实验动物研究中心, 动物实验经由扬州大学机构动物保护与使用委员会批准。适应性喂养 3 d 后, 小鼠随机分为 4 组($n=7$): 正常组、LPS 组、LPS+OA NPs 组和 LPS+OA-BA NPs 组。以尾静脉注射方式给药(20 mg/kg), 预给药 3 d 后, LPS 组、LPS+OA NPs 组和 LPS+OA-BA NPs 组小鼠腹腔注射 LPS (2 mg/kg)。所有小鼠禁水禁食 6 h 后麻醉并通过颈椎脱臼方式处死小鼠。注: 因 BA NPs 粒径较大, 通过尾静脉注射给药致小鼠呼吸急促、全身抽搐, 并导致部分小鼠死亡, 表现出很强的毒性作用, 限制了其实际应用, 因此本研究未设 BA NPs 对照组。

1.3.8 Western blot检测肺组织中蛋白表达水平

取适量肺组织, 转移至 RIPA 裂解缓冲液中, 使用组织匀浆器研磨肺组织, 并在 4 °C, 12 000 r/min 离心 5 min 提取收集蛋白。考马斯亮蓝法检测组织蛋白含量, 所得样品至 -80 °C 冰箱中保存备用。将等量蛋白上样到质量分数 10% 的 SDS-PAGE 凝胶上分

离, 转移到 PVDF 膜, 质量分数 5% 的 BSA 封闭 2 h, 然后一抗、二抗孵育, 通过增强化学发光系统成像。

1.4 数据处理

使用 GraphPad Prism 9.5 对数据进行统计分析。所有定量数据均以均值 $\pm$ 标准差表示。两组样品间的差异采用配对样本均值检验分析评估, P 值 < 0.05 具有统计学意义。(* 代表 $P < 0.05$; ** 代表 $P < 0.01$)。

2 结果与讨论

2.1 OA-BA NPs 的制备

本研究应用不经任何修饰的纯天然齐墩果酸和白桦脂酸作为功效成分 (结构式图 1a 所示), 采用

超分子共组装策略, 应用乳化溶剂挥发法制备超分子复合纳米制剂。NPs 形貌如图 1b 所示, OA 自组装成形貌相对均一的不规则球形纳米颗粒, BA 可自组装成微米级纤维形貌, 而 OA-BA 则形成了不同于球形和纤维形状的镰形形貌, 这表明, 两种化合物形成了超分子共组装复合纳米颗粒。研究表明, 不同形貌的 NPs 对细胞摄取和运输有很大影响, 并认为非球型纳米颗粒比球形纳米颗粒更具细胞摄入优越性^[26]。进一步通过接触角测定了 OA、BA 原药以及 OA-BA NPs 的亲疏水性, 结果如图 1c 所示, OA、BA 原药水接触角分别为 92.8° 和 97.6° , 表现为疏水性, OA-BA NPs 的接触角为 36.6° , 表现为亲水性, 亲水性的改善易于 NPs 在体内分散, 从而提高化合物的体内生物利用度。

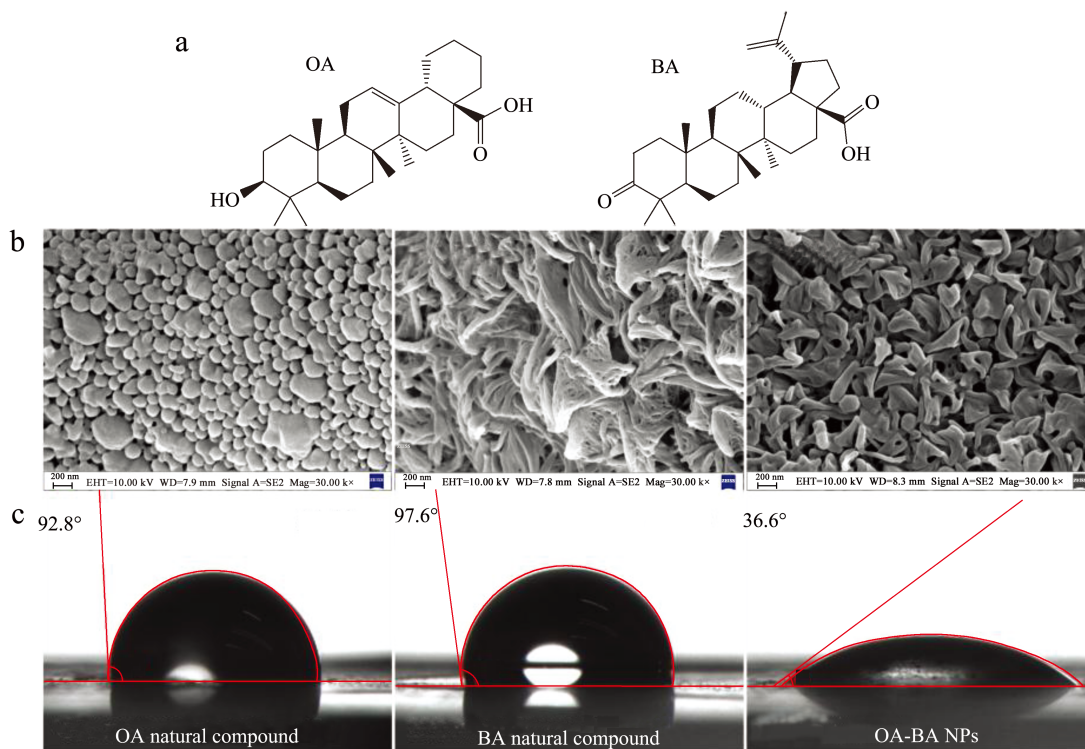


图 1 纳米颗粒的微观形态和疏水性测试

Fig.1 Microscopic morphology and hydrophobicity test of different nanoparticles

注: a 为 OA、BA 化学结构式, b 依次为 OA、BA 和 OA-BA NPs 的 SEM 图像, c 为 OA 和 BA 原药与 OA-BA NPs 的接触角。

2.2 OA-BA NPs 理化特性表征

OA-BA NPs 的粒径分布及表面电荷结果如图 2a 所示, OA NPs 和 BA NPs 平均亲水性直径分别约 320 nm 和 710 nm, PDI 分别为 0.156 和 0.576, OA-BA NPs 平均亲水性直径约 360 nm, PDI 为 0.403。进一步采用 ImageJ 图像处理和分析软件对 SEM 图像中 OA-BA NPs 平均宽度进行测定, 结果约 55 nm。相关研究表明^[30], NPs 粒径在小于 300 nm 为宜,

为确定制剂的安全性, 通过尾静脉注射方式分别将 OA NPs、BA NPs 和 OA-BA NPs 注射于小鼠体内, 并观察小鼠状态, 结果注射 BA NPs 表现出呼吸急促、全身抽搐并死亡现象, 其余组未见任何异常反应。这表明 BA NPs 应用受到限制, 不能作为纳米制剂通过尾静脉治疗, OA-BA NPs 能够扩展 BA 的应用价值。NPs 的表面电荷测定结果显示 (图 2b), OA NPs 表面电荷约 -7.0 ± 0.5 , BA NPs 表面

电荷约 -3.8 ± 0.7 , OA-BA NPs 表面电荷约 -2.7 ± 0.4 , 均显示出微负电荷。研究报道^[30], 带有中性或微负表面电荷的 NPs 能够减少血清蛋白吸附延长血液半衰期, 并且在避免非特异性器官摄取方面也更具有优势。进一步以粒径大小为评价指标, 测定了 OA-BA NPs 冻干粉经过不同贮藏时间后的粒径分布情况, 结果显示 (图 2c), OA-BA NPs 在 4 周内表现出良好的分散性和稳定性。随后通过体外模拟血液弱碱性 (pH 值 7.4) 环境和溶酶体酸性 (pH 值 5.5) 环境, 分析评价了 OA-BA NPs 的缓释释放特性。结果如图 2d 所示, 37 °C 下, OA-BA NPs 在 pH 值 7.4 介质中 48 h 累计释放量约总质量的 80%, pH 值 5.5 介质中, 48 h 累计释放量将近总质量的 60%, 表现出良好的缓释释放特性。根据我们之前的研究推测, OA-BA NPs 呈现酸性环境相对稳定的特性, 可能是因为 NPs 表面带负电荷的原因^[29]。

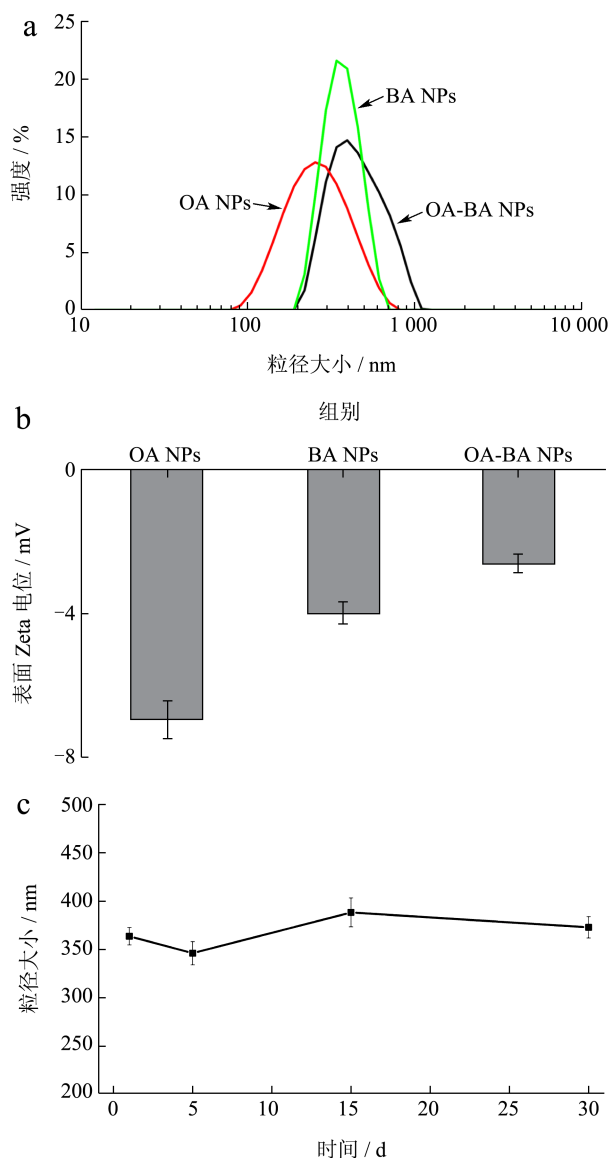


图 2 纳米颗粒的理化特性表征

Fig.2 Characterization of the physical and chemical properties of nanoparticles

注: a 为不同的纳米颗粒尺寸分布; b 为表面 Zeta 电位; c 为 OA-BA NPs 纳米粒子的稳定性测试; d 为 OA-BA NPs 在不同 pH 下的缓释释放特性。

2.3 OA-BA NPs对LPS诱导RAW264.7细胞炎症因子的影响

本研究使用小鼠单核巨噬细胞 (RAW264.7) 研究了 OA NPs、BA NPs、OA-BA NPs 对巨噬细胞的细胞毒性作用。结果显示 (图 3a), 三种 NPs 对 RAW264.7 细胞均呈现随质量浓度增加先促进细胞生长后抑制生长的趋势。处理 48 h 后, 质量浓度 200 $\mu\text{g/mL}$ 的 OA NPs 作用下, RAW264.7 细胞存活率为 77.7%; 质量浓度 100 $\mu\text{g/mL}$ 的 BA NPs 作用下, 细胞存活率为 76.3%; 质量浓度 25 $\mu\text{g/mL}$ 的 OA-BA NPs, RAW264.7 细胞存活率为 105.8%, 呈促进细胞生长作用。值得注意的是, 即使 OA-BA NPs 质量浓度增加至 400 $\mu\text{g/mL}$, 细胞存活率仍保持在 50% 以上, 表明 OA-BA NPs 对巨噬细胞有较高的安全使用剂量。通常巨噬细胞通过分泌促炎细胞因子 (如 $\text{TNF-}\alpha$ 、IL-6) 来启动促进早期免疫反应, 并通过分泌抗炎分子 (IL-10) 来支持炎症的消退, 巨噬细胞衍生的促炎细胞因子过量产生是病理性炎症的主要原因。接下来探究了 5 $\mu\text{g/mL}$ 下 OA NPs、BA NPs 和 OA-BA NPs 对 LPS 诱导 RAW 264.7 细胞的抗炎作用, 并通过 ELISA 法测定了抗炎和促炎细胞因子水平。促炎因子测定结果如图 3b、3c 所示, 与正常组相比较, LPS 刺激后 RAW 264.7 细胞产生的 $\text{TNF-}\alpha$ 、IL-6 水平显著增加。与 LPS 组相比较, 不同纳米粒子处理后, RAW 264.7 细胞产生的促炎因子得到明显改善, OA-BA NPs 较 OA NPs 和 BA NPs 促炎因子水平得到进一步改善, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。抗炎因子测定结果如图 3d 所示,

与正常组相比较,所有组别 IL-10 水平都有所提升。与 LPS 组相比较,OA-BA NPs 处理后,IL-10 水平显著增加 ($P<0.05$)。以上实验结果说明,OA NPs、BA NPs 和 OA-BA NPs 均可通过减少炎症因子释放减缓炎症进程,并且相同剂量下 OA-BA NPs 比 OA NPs 和 BA NPs 有更强的抗炎作用,这可能是因为齐墩果酸与白桦脂酸都有良好的抗炎活性。

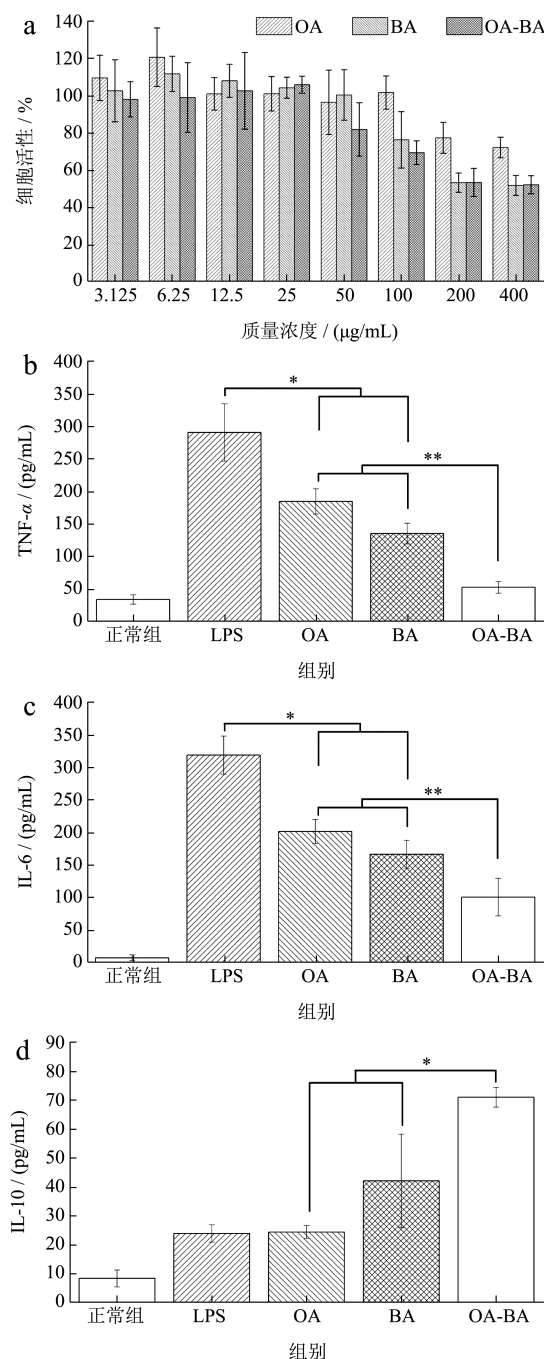


图3 纳米粒子的体外抗炎活性

Fig.3 *In vitro* anti-inflammatory activity of nanoparticles

注: a 为不同质量浓度 OA、BA 和 OA-BA NPs 对 RAW264.7 的细胞活性; b~d 为细胞上清液中 TNF-α、IL-6 和 IL-10 的表达水平。* $P<0.05$; ** $P<0.01$ 。

2.4 OA-BA NPs 减缓 LPS 诱导的小鼠急性肺损伤

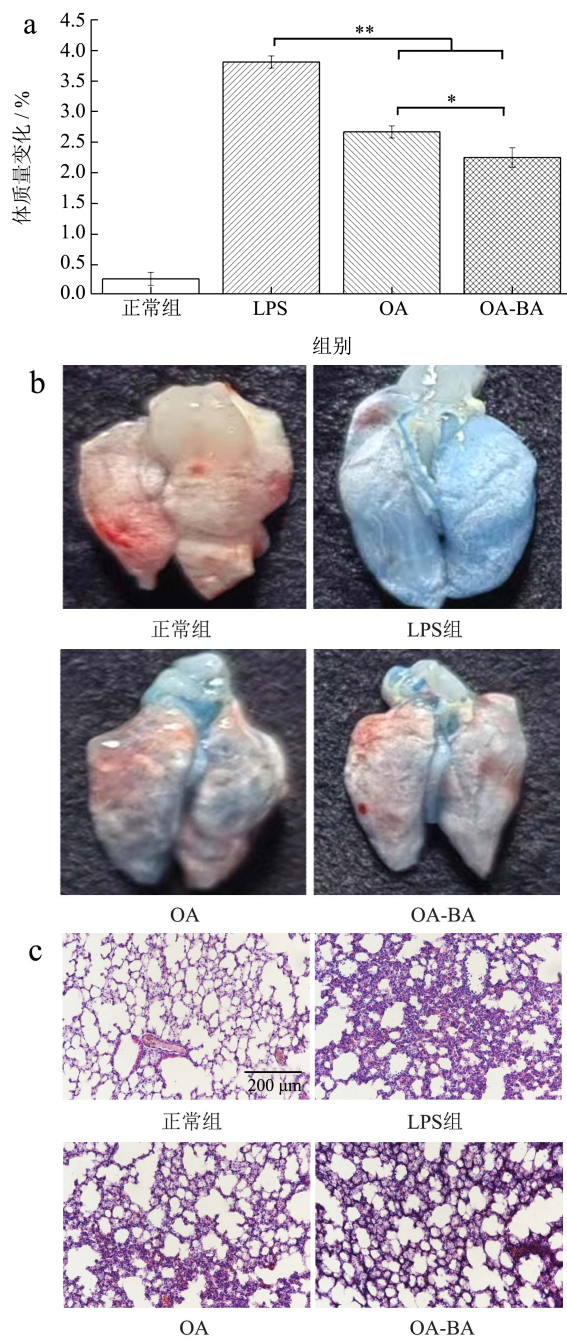


图4 OA-BA NPs 改善 LPS 诱导的急性肺损伤的体内实验

Fig.4 *In vivo* experiment of OA-BA NPs improving LPS-induced acute lung injury

注: a 为 LPS 刺激后 6 h 小鼠的体重变化; b 为伊文思蓝法测定肺血管壁通透性; c 为肺组织 H&E 病理分析。* $P<0.05$; ** $P<0.01$ 。

脂多糖是革兰阴性菌细胞膜的主要成分,可作为急性肺损伤 (ALI) 的主要致病因素引发炎症反应^[27]。由于 BA NPs 粒径较大不能用于体内治疗,因此实验设 OA NPs 和 OA-BA NPs 组。为了确定

OA-BANPs 治疗功效,通过尾静脉注射法给予 OA-BA NPs,连续注射 3 d,最后一次注射 30 min 后,腹腔注射 LPS (2 mg/kg),并对小鼠体质量变化、肺组织血管壁通透性、肺组织病理变化进行分析。结果如图 4 所示,与 LPS 组相比较,OA NPs 与 OA-BA NPs 组小鼠体质量有所升高,且 OA-BA NPs 治疗组小鼠体质量减轻明显小于 OA NPs 组 ($P<0.05$),这表明 OA-BA NPs 对改善 LPS 诱导的全身炎症症状优于 OA NPs 组。肺微血管壁通透性增加是引起急性肺损伤的主要病理变化之一,进一步采用伊文思蓝法对各组小鼠进行了肺组织通透性测试。结果显示(图 4b),OA NPs、OA-BA NPs 均可改善肺血管壁通透性损伤。苏木精和伊红(Hematoxylin and Eosin, H&E)肺组织病理学检查结果显示(图 4c),与健康小鼠肺相比,LPS 刺激诱导了小鼠肺实质结构的重要变化,包括广泛的肺充血、肺泡壁厚度增加,明显的炎细胞浸润;OA NPs、OA-BA NPs 治疗组,能够显著改善这些病理变化,有效抑制 LPS 诱导的肺损伤程度。

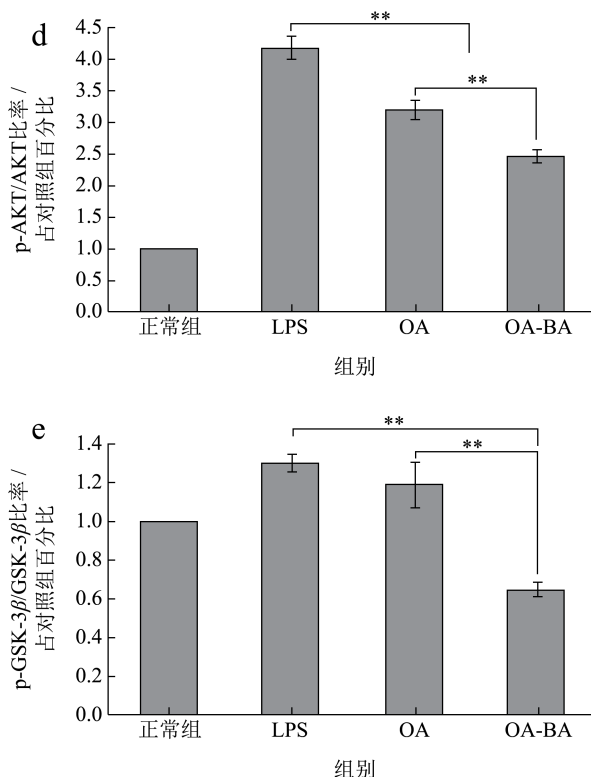
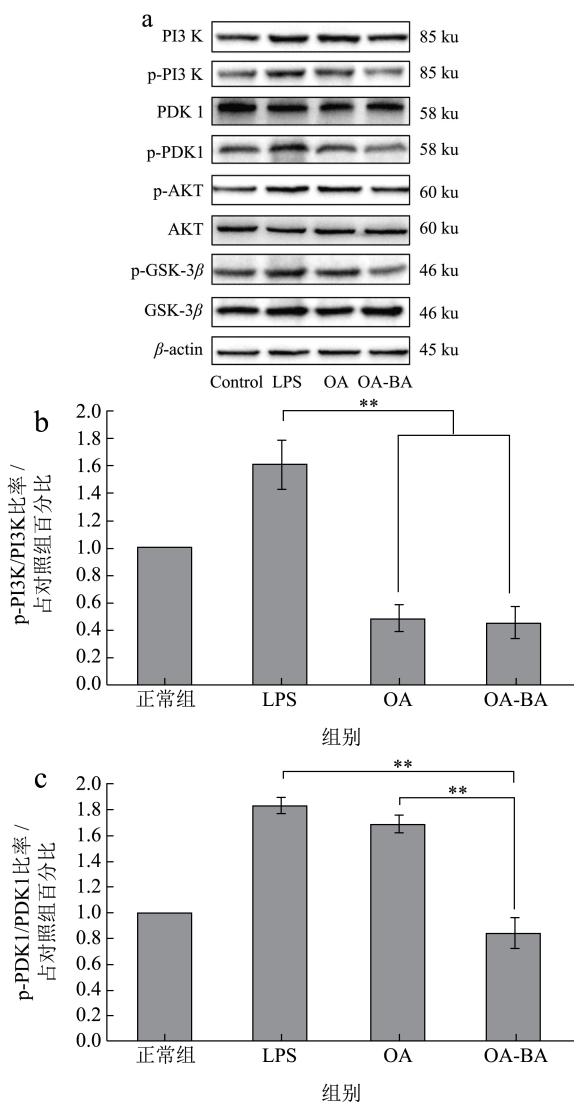


图 5 OA-BA NPs 对肺组织中 PI3K/AKT/GSK-3 β 信号通路相关蛋白的分析

Fig.5 Analysis of PI3K/AKT/GSK-3 β signaling pathway-related proteins in lung tissue by OA-BA NPs

注: a 为 PI3K/AKT/GSK-3 β 信号通路相关蛋白的表达; b-e 为灰度值比结果。 ** $P<0.01$ 。

2.5 OA-BANPs 治疗脓毒症小鼠信号通路分析

PI3K/AKT 信号通路是一种内源性负反馈或代偿机制,用于限制对有害刺激的促炎和凋亡事件的反应,刺激 PI3K 途径可能是预防或治疗脓毒症的有效方法^[31]。最近的证据表明,PI3K/AKT/GSK-3 β 通路参与炎症反应和免疫反应的调节。GSK-3 β 是 AKT 的重要底物,当 AKT 被激活时,它可以通过磷酸化降低 GSK-3 β 的活性,抑制下游炎症反应或细胞凋亡,从而发挥抗炎作用^[32,33]。相关研究表明,OA 能够通过 PI3K/AKT 途径改善肾缺血再灌注损伤的症状^[34];BA 可通过激活 PI3K/AKT 信号通路来预防脑缺血/再灌注损伤^[35]。这些发现表明,这两种化合物在治疗炎症疾病方面具有潜力,因此推测 OA-BA 可能具有调节 PI3K/AKT/GSK-3 β 通路的潜力,以防止 LPS 诱导的肺损伤。结果如图所示(图 5),与 LPS 组相比,OA-BA NPs 处理组 p-PDK1/PDK1、p-PI3K/PI3K、p-AKT/AKT、p-GSK-3 β /GSK-3 β 蛋白比率降低显著,且 OA-BA NPs 较 OA NPs 相关蛋白表达水平平均进一步降低 ($P<0.05$)。以上实验结

果表明, OA-BA NPs 可通过 PI3K/AKT/GSK-3 β 信号通路改善 LPS 诱导的急性肺损伤。

3 结论

LPS 诱导的炎症, 在巨噬细胞系到活生物体内实验动物研究是临床前研究中药物发现方案的一条途径。本研究基于齐墩果酸和白桦脂酸成功构建了水溶性好、稳定性高, 具有缓释释放特性的双药纳米颗粒, 探索了纯天然小分子化合物构建纳米药的可行性。体外实验结果证实, OA-BA NPs 对 LPS 诱导的巨噬细胞炎症反应具有一定的保护作用, 且效果优于 OA NPs 和 BA NPs。尽管齐墩果酸和白桦脂酸抵抗各种炎症疾病的作用已得到认可, 这项研究中, 进一步探索了双药纳米制剂通过抑制 PI3K/AKT/GSK-3 β 信号通路发挥抗炎作用的潜在机制。总之, 本研究表明基于天然小分子构建的纳米药代表了一种新的有效治疗方法。

参考文献

- [1] FLEISCHMANN-STRUZEK C, MELLHAMMAR L, ROSE N, et al. Incidence and mortality of hospital-and ICU-treated sepsis: results from an updated and expanded systematic review and meta-analysis [J]. Intensive Care Medicine, 2020, 46(8): 1552-1562.
- [2] GOTTS J E, MATTHAY M A. Sepsis: pathophysiology and clinical management [J]. Bmj-British Medical Journal, 2016, 353(i1585): 1-20.
- [3] RHODES A, EVANS L E, ALHAZZANI W, et al. Surviving sepsis campaign: International guidelines for management of sepsis and septic shock: 2016 [J]. Intensive Care Medicine, 2017, 43(3): 486-552.
- [4] LUHR R, CAO Y, SÖDERQUIST B, et al. Trends in sepsis mortality over time in randomised sepsis trials: a systematic literature review and meta-analysis of mortality in the control arm, 2002-2016 [J]. Critical Care, 2019, 23(1): 241.
- [5] TAJ M, BRENNER M, SULAIMAN Z, et al. Sepsis protocols to reduce mortality in resource-restricted settings: A systematic review [J]. Intensive and Critical Care Nursing, 2022, 72: 103255.
- [6] RIETSCHEL E T, KIRIKAE T, SCHADE F U, et al. Bacterial endotoxin: molecular relationships of structure to activity and function [J]. FASEB Journal, 1994, 8(2): 217-225.
- [7] ROSSAINT J, ZARBOCK A. Pathogenesis of multiple organ failure in sepsis [J]. Critical Reviews in Immunology, 2015, 35(4): 277-291.
- [8] TORRES L K, PICKKERS P, VAN DER POLL T. Sepsis-induced immunosuppression [J]. Annual Review of Physiology, 2022, 84: 157-181.
- [9] HUANG Y, ZHOU R B. Cytosolic transfer of circulating LPS by EVs [J]. Nature Cell Biology, 2023, 25(12): 1729-1731.
- [10] LORENCIO CARDENAS C, YEBENES J C, VELA E, et al. Trends in mortality in septic patients according to the different organ failure during 15 years [J]. Critical Care, 2022, 26(1): 302.
- [11] NIEDERMAN M S, BARON R M, BOUADMA L, et al. Initial antimicrobial management of sepsis [J]. Critical Care, 2021, 25(1): 307.
- [12] PARK I, KIM M, CHOE K, et al. Neutrophils disturb pulmonary microcirculation in sepsis-induced acute lung injury [J]. European Respiratory Journal, 2019, 53(3): 1800786.
- [13] DUSHIANTHAN A, GROCOTT M P, POSTLE A D, et al. Acute respiratory distress syndrome and acute lung injury [J]. Postgraduate Medical Journal, 2011, 87(1031): 612-622.
- [14] CASTELLANO J M, RAMOS-ROMERO S, PERONA J S. Oleanolic acid: Extraction, characterization and biological activity [J]. Nutrients, 2022, 14(3): 623.
- [15] CHEN F, LIU D L, WANG W, et al. Bioactive triterpenoids from *Sambucus javanica* Blume [J]. Natural Product Research, 2020, 34(19): 2816-2821.
- [16] ZHU S S, QIU Z C, QIAO X G, et al. Creating burdock polysaccharide-oleanolic acid-ursolic acid nanoparticles to deliver enhanced anti-inflammatory effects: fabrication, structural characterization and property evaluation [J]. Food Science and Human Wellness, 2023, 12(2): 454-466.
- [17] PENG X P, LI X H, LI Y, et al. The protective effect of oleanolic acid on NMDA-induced MLE-12 cells apoptosis and lung injury in mice by activating SIRT1 and reducing NF- κ B acetylation [J]. International Immunopharmacology, 2019, 70: 520-529.
- [18] PENG H B, WANG R X, DENG H J, et al. Protective effects of oleanolic acid on oxidative stress and the expression of cytokines and collagen by the AKT/NF- κ B pathway in silicotic rats [J]. Molecular Medicine Reports, 2017, 15(5): 3121-3128.
- [19] SANTOSA R S, SILVA P L, DE OLIVEIRA G P, et al. Oleanolic acid improves pulmonary morphofunctional parameters in experimental sepsis by modulating oxidative and apoptotic processes [J]. Respiratory Physiology & Neurobiology, 2013, 189(3): 484-490.
- [20] OLIVEIRA-COSTA J F, MEIRA C S, NEVES M V G D, et al. Anti-inflammatory activities of bBetulinic acid: A review [J]. Frontiers in Pharmacology, 2022, 13: 883857.
- [21] ZHENG L Y, ZOU X, WANG Y L, et al. Betulinic acid-nucleoside hybrid prevents acute alcohol-induced

- liver damage by promoting anti-oxidative stress and autophagy [J]. *European Journal of Pharmacology*, 2022, 914: 174686.
- [22] SEHIRLI O A, SENER G, SENER E, et al. Betulinic acid treatment ameliorates oxidative colonic injury in rats via its antioxidant activity [J]. *Gastroenterology*, 2008, 134(4): A263.
- [23] HUANG L, ZHU L J, OU Z P, et al. Betulinic acid protects against renal damage by attenuation of oxidative stress and inflammation via Nrf2 signaling pathway in T-2 toxin-induced mice [J]. *International Immunopharmacology*, 2021, 101: 108210.
- [24] LIU L X, WANG X C. Solubility of oleanolic acid in various solvents from (288.3 to 328.3) K [J]. *Journal of Chemical and Engineering Data*, 2007, 52(6): 2527-2528.
- [25] LI X, PENG X, ZOULIKHA M, et al. Multifunctional nanoparticle-mediated combining therapy for human diseases [J]. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 2024, 9(1): 1.
- [26] PETROS R A, DESIMONE J M. Strategies in the design of nanoparticles for therapeutic applications [J]. *Nature Reviews Drug Discovery*, 2010, 9(8): 615-627.
- [27] MUHAMMAD W, ZHAI Z H, WANG S Q, et al. Inflammation-modulating nanoparticles for pneumonia therapy [J]. *Wiley Interdisciplinary Reviews-Nanomedicine and Nanobiotechnology*, 2022, 14(2): e1763.
- [28] WANG J C, ZHAO H T, QIAO W S, et al. Nanomedicine-cum-carrier by co-assembly of natural small products for synergistic enhanced antitumor with tissues protective actions [J]. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 2020, 12(38): 42537-42550.
- [29] WANG J C, ZHAO H T, ZHI K K, et al. Exploration of the natural active small-molecule drug-loading process and highly efficient synergistic antitumor efficacy [J]. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 2020, 12(6): 6827-6839.
- [30] BLANCO E, SHEN H, FERRARI M. Principles of nanoparticle design for overcoming biological barriers to drug delivery [J]. *Nature Biotechnology*, 2015, 33(9): 941-951.
- [31] WILLIAMS D L, LI C F, HA T Z, et al. Modulation of the phosphoinositide innate resistance to polymicrobial 3-kinase pathway alters sepsis [J]. *Journal of Immunology*, 2004, 172(1): 449-456.
- [32] HE M, ZHANG Y, XIE F, et al. Role of PI3K/Akt/NF- κ B and GSK-3 β pathways in the rat model of cardiopulmonary bypass-related lung injury [J]. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 2018, 106: 747-754.
- [33] BAO Z K, MI Y H, XIONG X Y, et al. Sulforaphane ameliorates the intestinal injury in necrotizing enterocolitis by regulating the PI3K/Akt/GSK-3 signaling pathway [J]. *Canadian Journal of Gastroenterology and Hepatology*, 2022, 2022: 6529842.
- [34] YANG J R, LI X C, YANG H, et al. Oleanolic acid improves the symptom of renal ischemia reperfusion injury via the PI3K/AKT pathway [J]. *Urologia Internationalis*, 2021, 105(3-4): 215-20.
- [35] JIAO S J, ZHU H C, HE P, et al. Betulinic acid protects against cerebral ischemia/reperfusion injury by activating the PI3K/Akt signaling pathway [J]. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 2016, 84: 1533-1537.