



负载聚多巴胺纳米颗粒的活性氧类响应型水凝胶 调节炎症微环境保护神经元的体外研究*

肖 洋 刘 伟 孙天一 沙川路 王春兰 王常勇**

(军事科学院军事医学研究院, 北京 100850)

摘要 **目的** 脑缺血损伤后病灶微环境活性氧类 (reactive oxygen species, ROS) 过度蓄积引发氧化应激, 进而加剧神经炎症级联反应与神经元凋亡。针对这一病理过程, 本研究旨在构建负载聚多巴胺纳米颗粒 (polydopamine nanoparticles, PDA NPs) 的 ROS 响应型水凝胶, 解决脑缺血损伤微环境下抗氧化与抗炎协同调控、药物时空精准递送的核心问题, 通过体外模型系统评估该水凝胶的 ROS 响应释药特性及抗氧化、抗炎与神经保护作用, 为脑缺血损伤的原位注射靶向治疗奠定基础。**方法** 采用氧化自聚合的方法制备 PDA NPs, 随后将其负载于由 N1-(4-硼苄基)-N3-(4-硼苯基)-N1,N1,N3,N3-四甲基丙烷-1,3-二胺 (N1-(4-boronobenzyl)-N3-(4-boronophenyl)-N1,N1,N3,N3-tetramethylpropane-1, 3-diaminium, TSPBA) 和聚乙烯醇 (polyvinyl alcohol, PVA) 交联而成的 ROS 响应型水凝胶中。通过粒径分析、Zeta 电位分析、扫描电子显微镜、透射电子显微镜及流变仪等表征聚多巴胺纳米颗粒及水凝胶的形貌、力学性能与 ROS 响应释药特性。在体外以 HT22 神经元为模型, 借助 CCK-8、活/死细胞染色 (live/dead cell staining) 实验验证生物相容性, 构建氧葡萄糖剥夺/复氧模型 (oxygen-glucose deprivation/reoxygenation, OGD/R) 评估水凝胶 ROS 清除及抗神经元凋亡作用, 结合免疫荧光染色、逆转录实时荧光定量聚合酶链反应 (reverse transcription quantitative real-time polymerase chain reaction, RT-qPCR) 及 Transwell 共培养, 探究其对 BV-2 小胶质细胞极化的调控及间接神经保护效能。**结果** 制备的 PDA NPs 为粒径均一且带负电的球形纳米颗粒, 兼具良好的生物相容性与抗氧化性能。制备的负载 PDA NPs 的 ROS 响应型水凝胶, 可在 ROS 富集的微环境中响应 ROS 并释放 PDA NPs, 且表现出优异的抗氧化性能。体外细胞实验结果表明, 该水凝胶可有效清除神经元 OGD/R 模型中过量产生的 ROS, 显著抑制神经元凋亡, 同时能有效促进小胶质细胞向抗炎 M2 表型极化, 进而显著降低共培养体系中受损神经元的凋亡水平。**结论** 本研究成功制备出可注射的负载 PDA NPs 的 ROS 响应型水凝胶, 该材料可在 ROS 富集微环境中响应释放 PDA NPs, 兼具优异的抗氧化性能, 并可以调控小胶质细胞极化、抑制炎症反应, 通过抗氧化-抗炎协同策略实现了显著的体外神经保护效果。该水凝胶为聚多巴胺等生物活性材料的靶向递送提供了新策略, 也为脑缺血损伤的原位注射治疗奠定了重要实验基础。

关键词 活性氧类响应型水凝胶, 聚多巴胺, 免疫炎症微环境, 神经保护

中图分类号 Q819, R743.3, R651.1+5

DOI: 10.3724/j.pibb.2026.0094

CSTR: 32369.14.pibb.20260094

缺血性脑卒中 (ischemic stroke, IS) 与创伤性脑损伤 (traumatic brain injury, TBI) 等脑损伤疾病的临床治疗窗口很短, 绝大多数患者容易错失最佳治疗时机, 致预后不良, 现已成为全球致死致残的主要病因之一^[1]。其病灶微环境因缺血或机械应力导致线粒体功能障碍, 活性氧类 (reactive oxygen species, ROS) 激增, 外周中性粒细胞与单核细胞浸润, 小胶质细胞迅速极化为 M1 型, 释放肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)、

白介素 (interleukin, IL)- 1β 等促炎细胞因子正反馈放大炎症级联反应^[2-4], 随后酸中毒、谷氨酸兴奋性毒性及铁离子蓄积触发脂质过氧化, 神经元凋亡与轴突断裂, 最终演变为不可逆的神经功能缺损^[5]。目前的临床治疗面临很大的挑战: 一方面

* 中国科技创新2030-重大项目 (2021ZD0201600, 2021ZD0201604) 资助。

** 通讯联系人。

Tel: 010-66931377, E-mail: wcy2000_zm@163.com

收稿日期: 2026-02-26, 接受日期: 2026-05-14

系统给药的抗氧化剂或抗炎药因血脑屏障 (blood brain barrier, BBB) 完整性受损导致病灶浓度不足而外周免疫抑制明显; 另一方面无法在 ROS 峰值窗口精准释药, 也无法随炎症消退自动终止干预, 长期高剂量反而干扰神经可塑性修复。因此, 基于 IS 等脑损伤疾病的微环境响应特征及治疗时序需求, 亟须构建能感知 ROS 信号并按需协同调控的智能生物材料, 以突破现有瓶颈^[6]。体外研究能够为解析 ROS 激增、炎症放大、神经细胞死亡等核心事件的分子机制提供可控、可重复的模型体系, 是阐明脑损伤病理进程、筛选与验证干预靶点的关键环节。因此, 本研究选择体外细胞模型对生物材料的抗氧化、抗凋亡等神经保护作用的有效性进行系统评估, 以期能够对后续应用生物材料治疗炎症相关脑损伤疾病提供可靠依据。

近年来, 可注射的 ROS 响应型水凝胶在生物学领域应用非常广泛^[7-8]。其水凝胶骨架多引入苯硼酸酯或硫缩酮等 ROS 响应性基团, 可在 $\cdot\text{OH}$ 、 H_2O_2 或超氧化物升高 10~100 $\mu\text{mol/L}$ 范围内迅速断键, 实现药物脉冲式释放^[9-10]。在先前研究中已证实: 一种基于羧甲基壳聚糖 (carboxymethyl chitosan, CMCS) 的智能多功能 ROS 响应型超分子水凝胶可以通过清除自由基促进糖尿病伤口愈合^[11]; 已有相关研究表明, 交联剂 N1-(4-硼苄基)-N3-(4-硼苯基)-N1,N1,N3,N3-四甲基丙烷-1,3-二铵 (N1-(4-boronobenzyl)-N3-(4-boronophenyl)-N1,N1,N3,N3-tetramethylpropane-1,3-diaminium, TSPBA) 与聚乙烯醇 (polyvinyl alcohol, PVA) 体系凭借 TSPBA 的 ROS 敏感性, 在骨再生^[12]、心肌梗死^[13] 及皮肤损伤修复^[14] 中可以时空可控响应 ROS 释放活性成分, 清除 ROS 并发挥抗炎作用。

聚多巴胺 (polydopamine, PDA) 是一种新型生物纳米材料, 因其卓越的生物相容性和显著的抗氧化性能而受到广泛关注。PDA 分子结构中富含大量邻苯二酚, 兼具自由基捕捉、金属离子螯合及近红外光热转换能力, 经过功能化修饰已被用于心脏^[15] 与神经损伤修复^[16]。此外, PDA 还具备调节小胶质细胞极化状态的能力, 可促使小胶质细胞从促炎的 M1 型向抗炎的 M2 型转变, 发挥免疫调节作用, 这对于减轻神经炎症和促进神经修复至关重要^[17]。

综上, 尽管聚多巴胺纳米颗粒 (polydopamine nano-particles, PDA NPs) 与 TSPBA-PVA 基 ROS

响应型水凝胶在生物医学领域均已展现出应用潜力, 但将 PDA NPs 与 TSPBA-PVA 动态共价交联网络结合, 并用于脑缺血损伤微环境的抗氧化-抗炎协同调控尚未见报道。针对脑损伤中 ROS 富集的病理微环境, 本研究构建负载 PDA NPs 的 TSPBA-PVA 基 ROS 响应型可注射水凝胶 (polydopamine/hydrogel, PDA/Gel), 利用 TSPBA 中的苯基硼酸酯键与 ROS 特异性断裂实现 PDA NPs 按需释放, 精准递送至病变部位。本研究全面表征了该水凝胶体系的 ROS 响应性、抗氧化性、生物相容性和可注射性, 突破了单一 PDA 给药缺乏病灶靶向性、难以实现时空可控释放的局限, 通过 ROS 响应性实现 PDA NPs 在缺血损伤区的按需递送与精准控释, 同时借助水凝胶载体提升纳米颗粒的局部滞留与生物利用度。此外, 在体外细胞实验中证实了该水凝胶在病灶微环境中特异性响应并发挥 ROS 清除、小胶质细胞极化调控与神经保护的三重作用, 为脑缺血损伤的原位精准干预提供了新型智能递送策略, 也为 PDA 类生物活性材料在中枢神经系统疾病中的时空可控应用提供了实验依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞系

本实验所用小鼠海马神经元细胞系 (HT22 细胞) 购自武汉普诺赛生命科技有限公司, 小鼠小胶质细胞系 (BV-2 细胞) 购自浙江美森细胞科技有限公司。

1.1.2 试剂与耗材

4-(溴甲基) 苯硼酸、N,N-二甲基甲酰胺、N, N, N', N'-四甲基-1, 3-丙二胺和四氢呋喃购自上海麦克林生化科技股份有限公司; 盐酸多巴胺、乙醇、聚乙烯醇 (72 ku, 98% 纯度) 购自上海阿拉丁生化科技股份有限公司; 1 ku 透析袋、过氧化氢含量检测试剂盒、羟自由基清除能力检测试剂盒和超氧化物歧化酶 (superoxide dismutase, SOD) 活性检测试剂盒购自北京索莱宝科技有限公司; HT22 细胞完全培养基购自武汉普诺赛生命科技有限公司; BV-2 细胞完全培养基购自浙江美森细胞科技有限公司; 0.25% 胰酶 (Gibco) 购自北京天光百全科技有限公司; TUNEL 试剂盒购自南京诺唯赞生物科技股份有限公司; 所有抗体购自 Abcam 公司。

1.2 方法

1.2.1 水凝胶的制备

在碱性条件下, 采用氧化自聚合的方法制备 PDA NPs: 取 2.5 ml 氨水、40 ml 乙醇和 90 ml 去离子水, 搅拌 30 min 混合均匀。随后向上述混合溶液中加入 50 mg 的盐酸多巴胺搅拌反应 24 h, 随后使用 1 ku 的透析袋透析 3 d。

交联剂 TSPBA 的制备: 在 60°C 的条件下, 将 0.5 g 4-(溴甲基) 苯硼酸分散到 10 ml 的 N,N-二甲基甲酰胺中搅拌溶解。随后加入 800 μ l N, N, N', N'-四甲基-1, 3-丙二胺, 使其反应过夜。使用四氢呋喃清洗 3 次后, 真空干燥去除残留的溶剂得到固体 TSPBA。将制备固体 TSPBA 溶解于去离子水中得到 2% (质量百分比) 的交联剂溶液。

取上述合成的 PDA 溶液 20 ml (浓度 100 mg/L), 向其中加入 1 g 的 PVA 在 90°C 的条件下搅拌混合, 直到 PVA 粉末全部溶解, 得到含有 PDA NPs 的 PVA 溶液。最后取等体积的 TSPBA 和含有 PDA NPs 的 PVA 溶液搅拌混合, ROS 响应型水凝胶即可生成。

1.2.2 纳米颗粒的表征

采用扫描电子显微镜 (scanning electron microscope, SEM) (德国 ZEISS Gemini SEM 300) 观察 PDA NPs 形貌: 取约 1 mg 纳米颗粒分散于 2 ml 无水乙醇, 超声 5~10 min, 取 5~10 μ l 悬液滴于硅片风干, 喷金 30~60 s 后, 真空下聚焦拍摄。将 PDA NPs 经乙醇超声分散后滴加于铜网, 负染干燥, 采用透射电子显微镜 (transmission electron microscope, TEM) 明场模式观察其内部微观结构。采用纳米粒度及 Zeta 电位分析仪, 取 1 mg PDA NPs 分散于 10 ml 超纯水, 超声 15 min 制得悬液, 以动态光散射 (dynamic light scattering, DLS) 模式 (25°C, 重复 3 次) 测粒径、ELS 模式 (25°C, 重复 3 次) 测 Zeta 电位, 仪器自动计算均值并整理数据。采用过氧化氢、羟自由基清除及 SOD 活性检测试剂盒, 按说明书检测 PDA NPs 的 ROS 清除性能。将纳米颗粒配制成 50、100、200 mg/L 梯度悬液, 设空白组、阳性对照组, 分别通过对应试剂盒反应流程, 在 405、536、560 nm 处测吸光度, 最终按公式定量清除能力并记录。

1.2.3 水凝胶的表征

水凝胶冷冻干燥切取断面并喷金处理后, 使用 SEM 观察表面形貌。使用流变仪 (安东帕, 奥地

利) 进行水凝胶的时间-频率扫描, 检测储能模量和损耗模量。将水凝胶浸泡于含有不同浓度过氧化氢 (20、100、200 和 300 μ mol/L) 的 PBS 缓冲液中, 评价水凝胶的 ROS 响应性。为实现 PDA NPs 的准确定量, 配制 0、50、100、200、400、600 mg/L 的 PDA NPs 标准溶液, 在特征波长 300 nm 处测定吸光度, 绘制标准曲线, 得到线性回归方程为 $Y=0.003\ 210X+0.328\ 7$ ($R^2=0.999\ 5$), 线性范围为 0~600 mg/L。基于该标准曲线, 对水凝胶释药上清的吸光度进行换算, 计算 PDA NPs 的累积释放率。

1.2.4 细胞培养和活力实验

在 HT22 细胞完全培养基中培养 HT22 细胞, 所有细胞均培养于 37°C、含 5% CO₂ 的加湿培养箱中。所有体外细胞实验均使用处于对数生长期的细胞, 使用活/死细胞染色实验和 CCK-8 试剂盒检测细胞活力。

CCK-8: 将细胞密度为 1×10^4 /孔的 HT22 细胞接种于 96 孔板中, 贴壁后更换不同浓度的 PDA NPs 溶液和水凝胶浸提液, 在培养箱中孵育 24 h。随后, 向各孔中依次加入 10 μ l CCK-8 溶液, 再孵育 4 h, 使用酶标仪在 450 nm 处记录各孔的吸光度。

活/死细胞染色实验: 将 HT22 细胞以 1.5×10^5 /孔的密度接种于 24 孔板中, 贴壁后更换水凝胶浸提液, 在 CO₂ 培养箱中培养 24 h 和 72 h 后用 AM/PI 染色 20 min, 荧光显微镜成像。

1.2.5 体外 OGD/R 模型的建立

HT22 细胞在 24 孔板中贴壁后吸去培养液, 并用 PBS 溶液清洗 2~3 次。然后, 加入无糖无血清的 DMEM 培养基。正常组为常规培养的 HT22 细胞。处理组的细胞则置于通气 0.1% O₂、5% CO₂ 的缺氧装置中 (无氧培养箱), 进行 4 h 的缺氧处理后停止通气。复氧时, 将无糖培养基替换为负载 100 mg/L PDA NPs 的水凝胶浸提液, 继续培养 24 h。

1.2.6 Transwell 共培养

培养基润湿 Transwell 小室底膜后, 将 PBS 处理的 BV-2 细胞、脂多糖 (lipopolysaccharide, LPS) 诱导的 BV-2 细胞 (BV2-M1)、PDA/Gel 处理的 BV2-M1 细胞分别接种在 Transwell 培养皿的顶室中, 然后将神经元样 HT22 细胞接种在基底室中, 实现 BV-2 细胞和 HT22 细胞的共培养, 常规孵育 12 h 后进行活/死细胞染色和 TUNEL 染色^[18]。

1.2.7 免疫荧光染色

所有细胞样品用PBS润洗2次,用4%多聚甲醛4℃固定30 min,用PBS洗涤3次,5 min/次。随后,将0.3%的Triton X-100常温通透细胞30 min,用PBS缓冲液润洗3次(5 min/次),在37℃下用蛋白质封闭液封闭60 min,随后在4℃下用抗体稀释液按1:500稀释的一抗(CD16/32、CD206)孵育细胞过夜。用PBS洗涤后,将细胞与1:500稀释的二抗(Alexa Fluor® 488、Alexa Fluor® 568)室温避光孵育2 h,并用DAPI对细胞核进行染色。使用激光共聚焦显微镜(蔡司)观察和分析图像。

1.2.8 RT-qPCR检测炎症相关因子

在6孔板中接种BV-2细胞 8×10^5 /孔,分别用PBS、LPS (1 mg/L)和LPS (1 mg/L) +PDA/Gel (100 mg/L)处理细胞24 h,采用Trizol法提取以上

各组细胞的总RNA,并反转录合成cDNA,选用甘油醛-3-磷酸脱氢酶(glyceraldehyde-3-phosphatedehydrogenase, GAPDH)为内参,使用SYBR®Premix Ex Taq™II试剂盒在LightCycler 480 II PCR系统(德国罗氏)上进行逆转录实时荧光定量聚合酶链反应(reverse transcription quantitative real-time polymerase chain reaction, RT-qPCR),试剂盒含有2 μ l cDNA、2 μ l引物(1 μ mol/L)、10 μ l SYBR绿色染料(2 $\times$)、6 μ l无核酸酶H₂O,总反应体积为20 μ l。反应条件如下:95℃ 30 s, 95℃ 3 s, 55℃ 30 s, 72℃ 30 s, 95℃ 1 min, 55℃ 30 s, 以及95℃ 30 s,共42个循环。通过熔解曲线确认PCR反应,并从PCR曲线获得样品的C_t值。使用2^{- $\Delta\Delta C_t$} 方法计算IL-1 β 、TNF- α 、IL-6炎症相关因子的相对表达水平。引物信息详见表1。

Table 1 Primers used for RT-qPCR analysis

Gene	Forward primer	Reverse primer
GAPDH	AGGTCGGTGTGAACGGATTTG	GGGGTCGTTGATGGCAACA
IL-1 β	TCGCAGCAGCACATCAACAAGAG	AGGTCCACGGGAAAGACACAGG
TNF- α	GCCACCACGCTCTTCTGTCTAC	GGTTTGTGAGTGTGAGGGTCTGG
IL-6	CTTCTTGGGACTGATGCTGGTGAC	AGGTCTGTTGGGAGTGGTATCCTC

1.3 统计学分析

使用GraphPad Prism 10软件进行数据处理,两组间差异使用非配对 t 检验评估,多组间比较采用单因素方差分析(ANOVA),结果用平均值+标准差表示。 $n=3$ 代表3次独立的生物学重复实验, $P<0.05$ 表示具有统计学差异。

2 结 果

2.1 PDA NPs的制备与表征

本研究首先制备了PDA NPs并对其理化性能进行了表征。通过在碱性条件下氧化自聚合的方法制备PDA溶液,最终冷冻干燥得到PDA NPs。通过SEM和TEM观察纳米颗粒的微观结构(图1a),结果显示,制备的PDA NPs为分散均匀的均一球状结构,证明PDA NPs的成功合成。粒径分析结果表明,PDA NPs的粒径为(123.1 ± 16.27) nm(图1b),与SEM结果一致。Zeta电位检测结果显示,PDA NPs的Zeta电位为-18.52 mV(图1c),表明其具有良好的稳定性,在分散体系中不容易团聚。作为水凝胶中核心的抗氧化成分,首先验证了不同浓度(50、100、200 mg/L)的PDA NPs对O²⁻、 $\cdot$ OH和H₂O₂的清除作用(图1d)。结果表明,

PDA NPs显示了较好的抗氧化性能,且随着浓度的增加,对O²⁻、 $\cdot$ OH、H₂O₂的清除效率显著增加,其中在100 mg/L条件下,PDA NPs对O²⁻的清除率达20%, $\cdot$ OH清除率达40%,H₂O₂清除率达53%。

2.2 PDA/Gel的制备与表征

ROS响应型水凝胶选用TSPBA和PVA体系,TSPBA中的苯基硼酸酯键可以与ROS反应而发生断裂,释放出包裹其中的纳米颗粒,达到智能响应按需释放和缓释的效果(图2a)。通过SEM观察水凝胶呈现出均匀的多孔网状结构(图2b),一方面相互连通的孔隙允许纳米颗粒自由扩散,另一方面多孔结构增大了环境中ROS的接触面积,对环境变化响应更快速。流变学检测表明,在25℃条件下,随着时间的推移,水凝胶储能模量(G')大于损耗模量(G''),表明固态水凝胶的成功形成(图2c)。此外,随着角频率的增加,水凝胶的黏度降低,表现出剪切稀化的特性(图2d)。在模拟炎症微环境的释放实验中进一步验证PDA/Gel在不同浓度H₂O₂(20、100、200和300 μ mol/L)中的ROS响应性,结果显示,PDA/Gel于80 h内呈ROS浓度依赖式快速释放负载的PDA NPs,80 h后释放趋于稳定,累计释放量基本不再显著增加(图2e)。

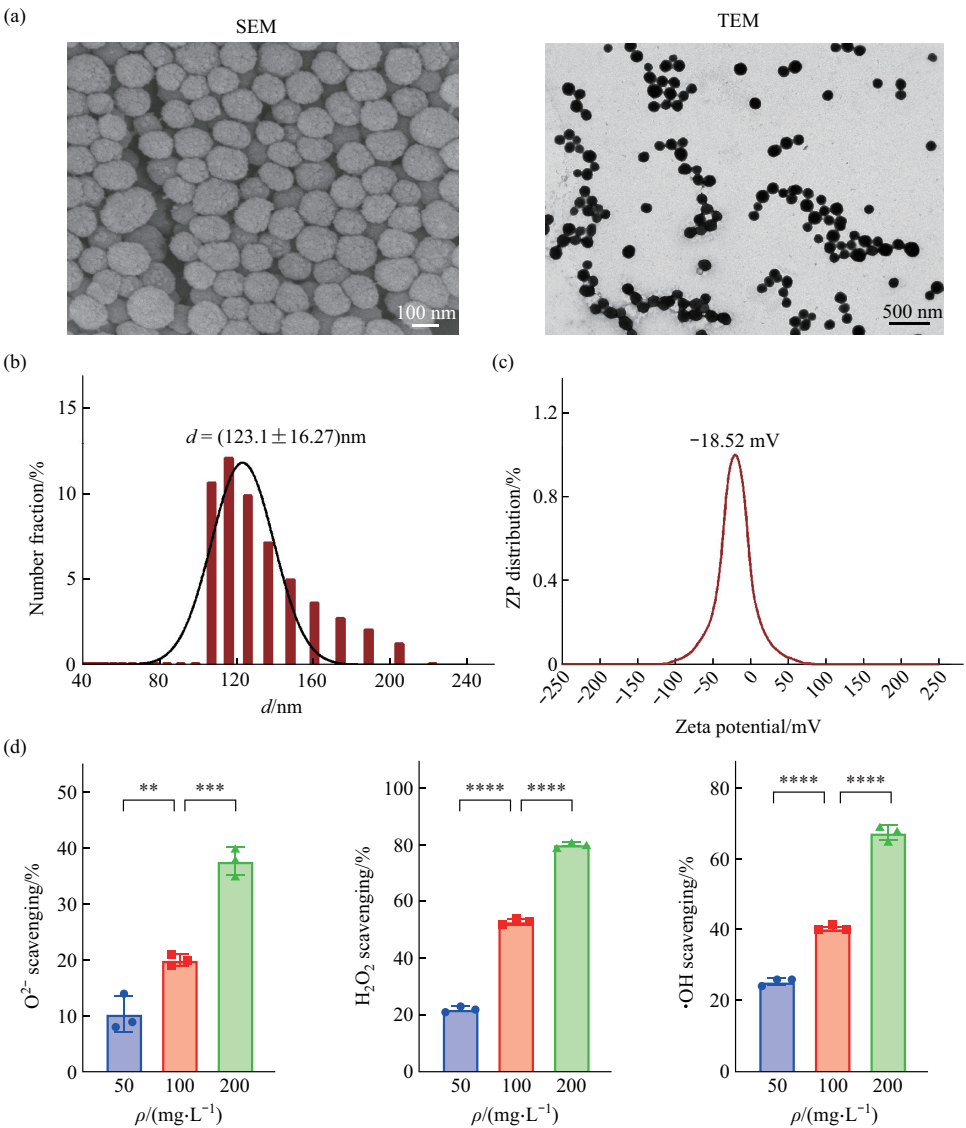


Fig. 1 Preparation and characterization of PDA nanoparticles

(a) SEM and TEM images of PDA NPs. (b) Particle size analysis of the PDA NPs. (c) Zeta potential of PDA NPs. (d) Antioxidant capacity of PDA NPs, $n=3$ for each group, data are presented as mean $\pm$ standard deviation, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$, **** $P<0.0001$.

进一步用DPPH试剂盒评价无响应性PVA、响应性TSPBA-PVA水凝胶以及负载PDA NPs的响应性水凝胶对ROS的清除能力。结果显示，无响应性PVA水凝胶无明显的ROS的清除能力，响应性TSPBA-PVA水凝胶ROS清除率为16% ($P<0.0001$)，而负载了PDA NPs的TSPBA-PVA水凝胶能够在同样条件下按需释放PDA，ROS清除率为37% (图2f)，明显高于空TSPBA-PVA水凝胶 ($P<0.0001$)。

2.3 PDA/Gel具有良好的细胞生物相容性

为确定适宜的PDA NPs实验浓度并评价PDA/Gel的生物安全性，首先将HT22细胞与不同浓度PDA NPs共培养24 h，采用CCK-8法检测细胞活

力 (图3a)。结果显示，50 mg/L处理后细胞存活率降至约85% ($P<0.05$)，100 mg/L PDA NPs处理后细胞存活率约为82% ($P<0.05$)，200 mg/L组细胞活力降至67%左右 ($P<0.001$)，表明该浓度PDA NPs会显著抑制细胞增殖。

考虑到水凝胶体系中PDA NPs的实际释放浓度与游离纳米颗粒不完全一致，进一步采用负载不同浓度PDA NPs的水凝胶浸提液与HT22细胞共培养24 h并进行CCK-8检测 (图3b)。结果表明，与对照组相比，50 mg/L和100 mg/L组细胞活力均无显著差异，而200 mg/L组细胞活力降至74%左右 ($P<0.01$)。100 mg/L组与50 mg/L组之间细胞活力

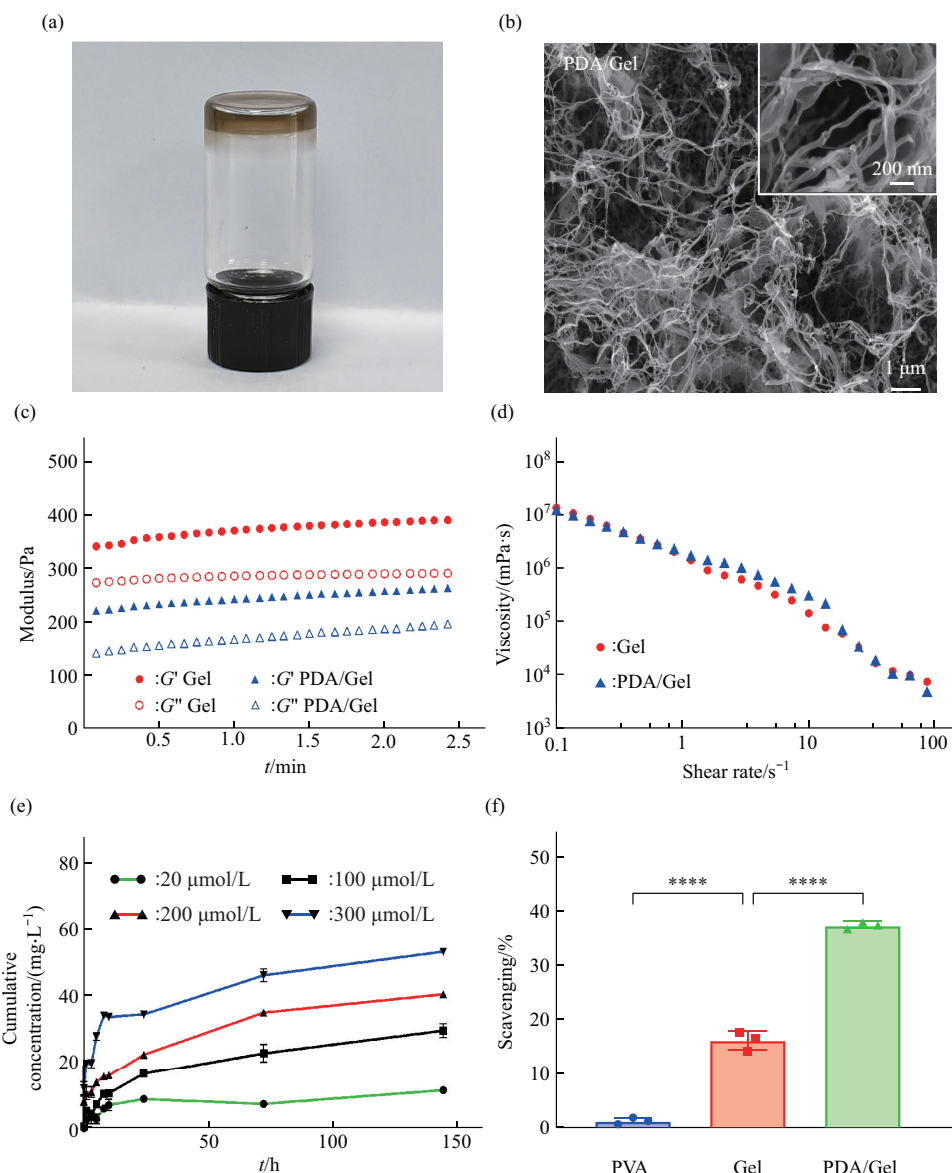


Fig. 2 Preparation and characterization of ROS-responsive injectable hydrogels loaded with PDA

(a) Photograph of the hydrogel. (b) Scanning electron microscopy (SEM) image of the hydrogel. (c) Storage modulus measurement of the hydrogel. (d) Viscosity of the hydrogel at different shear rates. (e) Cumulative release curves of the hydrogel in H₂O₂ solutions of different concentrations over time. (f) The hydrogel's scavenging effect on reactive oxygen species, $n=3$ for each group, data are presented as mean±standard deviation, **** $P<0.0001$.

无明显统计学差异。结合先前关于ROS清除效能的研究, 100 mg/L PDA NPs对O²⁻、·OH和H₂O₂的清除效果显著优于50 mg/L组, 因此本研究最终选取100 mg/L作为后续实验浓度。

在此基础上, 通过活/死细胞染色实验进一步评价水凝胶生物相容性, 将负载0、50、100 mg/L PDA NPs的水凝胶浸提液与HT22细胞共培养24 h和72 h。荧光结果显示, 100 mg/L组神经元存活状态与对照组无明显差异(图3c)。以上结果证实, 100 mg/L的PDA/Gel具有良好的细胞生物相容性,

可满足后续体外实验要求。

2.4 PDA/Gel可清除OGD/R模型中的ROS并减少神经元凋亡

在引起神经元损伤和细胞死亡的神经炎症的初始阶段, ROS积累是发病机制的关键因素之一。因此, 及时清除ROS可能是减少神经缺血损伤的有效途径。首先建立了HT22细胞的OGD/R模型以模拟体内炎症微环境, 进一步使用二氢乙啶(dihydroethidium, DHE)检测试剂盒检测PDA/Gel的ROS清除能力。如图4a所示, 该水凝胶可清

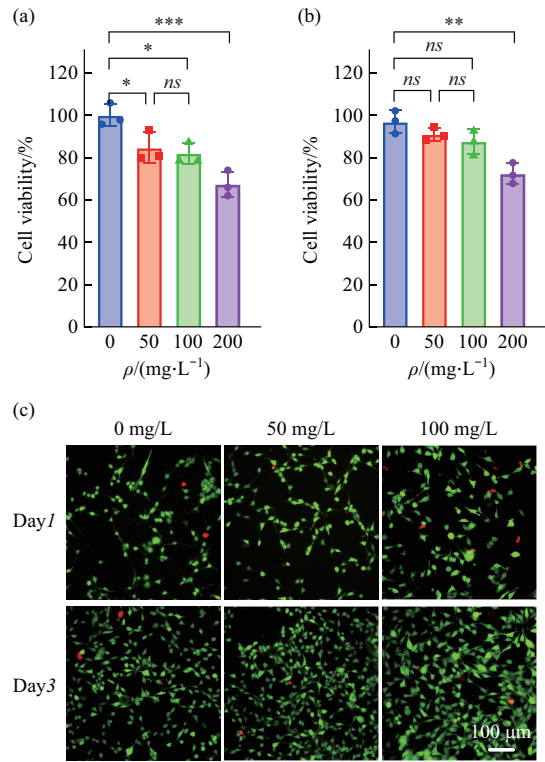


Fig. 3 Biocompatibility of PDA NPs and PDA/Gel hydrogel

(a) Statistical analysis of the viability of HT22 cells cultured in different concentrations of PDA NPs solutions using the CCK-8 method, with $n=3$ in each group. The data are presented as mean $\pm$ standard deviation, *ns* not significant. (b) Statistical analysis of the viability of HT22 cells cultured in the hydrogel extracts loaded with different concentrations of PDA NPs using the CCK-8 method, with $n=3$ in each group. The data are presented as mean $\pm$ standard deviation, *ns* not significant. (c) Representative images of live and dead cell staining of HT22 cells cultured in the PDA/Gel hydrogel extract, red staining indicates dead cells, and green staining indicates live cells. * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$, *ns*: not significant.

除 HT22 细胞 OGD/R 模型中的 ROS，与 OGD/R 组和 Gel 组相比，ROS 水平显著下降。为了进一步评价 PDA/Gel 的神经保护作用，对各组进行末端脱氧核苷酸转移酶介导的缺口末端标记（TUNEL）荧光染色，以检测细胞凋亡中的 DNA 片段化。图 4b 中结果显示，与 OGD/R 组相比，水凝胶浸提液处理后标记双链 DNA 断裂的绿色荧光显著下调，表明该水凝胶可以减少神经元凋亡，保护 OGD/R 模型中的受损神经元。以上结果表明，PDA/Gel 可以通过清除 OGD/R 模型中的 ROS 以保护神经元。

2.5 PDA/Gel 可促进小胶质细胞向抗炎 M2 表型极化

小胶质细胞是中枢神经系统中驻留的免疫细胞，在神经炎症中发挥关键的调节作用。根据其激活状态和功能特征，可分为 M1 型和 M2 型。M1 型主要诱导炎症反应，M2 型发挥抗炎和修复功能，因此通过应用生物材料调节小胶质细胞的转型成为

一种有前景的抗炎策略。为了证实水凝胶对小胶质细胞的反应性调节，使用 BV-2 细胞系建立了 LPS 诱导的炎症模型，随后进行 CD16/32 和 CD206 免疫荧光染色，以评估不同处理后的小胶质细胞转型情况。实验结果显示，与 PDA/Gel 浸提液共培养后，CD16/32 的荧光表达显著下调，表明 M1 型小胶质细胞减少（图 5a），CD206 的荧光表达显著上调，表明 M2 型小胶质细胞增加（图 5b）。使用 RT-qPCR 法进一步检测小胶质细胞中典型促炎细胞因子（TNF- α 、IL-6 和 IL-1 β ）的表达（图 5c），结果表明，与对照组相比，LPS 处理后 TNF- α 、IL-6 和 IL-1 β 表达水平显著上调，证明细胞炎症应激模型的成功建立。值得注意的是，与 LPS 处理组相比，细胞与 PDA/Gel 浸提液共培养后，TNF- α 、IL-6 和 IL-1 β 的表达水平显著下调。以上结果说明，PDA/Gel 可促进小胶质细胞由 M1 型向 M2 型极化，并调节炎症因子的产生，从而抑制炎症发生。

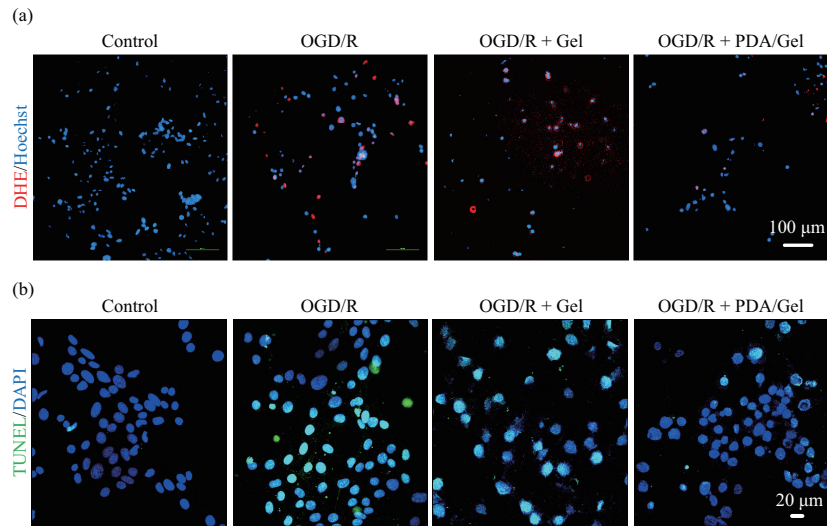


Fig. 4 The PDA/Gel hydrogel can eliminate ROS and reduce neuronal apoptosis
 (a) Representative images of ROS level staining. (b) Representative images of TUNEL apoptotic cell staining.

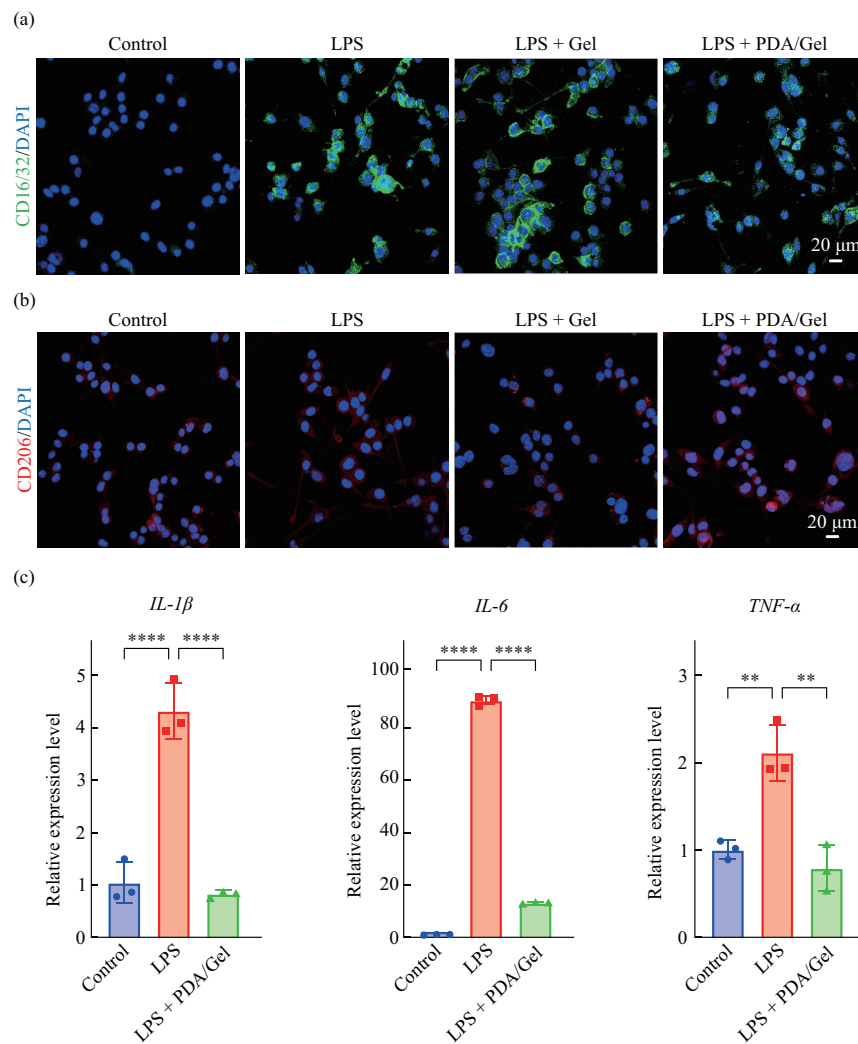


Fig. 5 The PDA/Gel hydrogel can promote the polarization of microglia to the anti-inflammatory M2 phenotype
 (a) Representative images of CD16/32 immunofluorescence staining. (b) Representative images of CD206 immunofluorescence staining. (c) RT-qPCR analysis of pro-inflammatory factor expression, $n=3$ for each group. Data are presented as mean±standard deviation, ** $P<0.01$, **** $P<0.0001$.

2.6 极化为M2型的小胶质细胞可在OGD/R模型中保护受损神经元

为了进一步确定PDA/Gel水凝胶浸提液对小胶质细胞的促极化作用是否能够保护共培养的神经元, 在OGD/R模型处理后, 将PBS处理的BV-2细胞 (BV2-M0)、LPS诱导的BV-2细胞 (BV2-M1) 和PDA/Gel处理的BV2-M1细胞分别接种在transwell培养皿的顶室中, 然后将HT22细胞接种在基底室中, 实现BV-2细胞和HT22细胞的共培养 (图6a), 观察神经元的活力。活/死细胞染色发现

(图6b), OGD/R模型处理后的HT22与PBS处理的BV2-M0 孵育后, HT22 细胞活力显著降低, 与BV2-M1 孵育后, HT22 细胞的活力降低更为明显, 这种作用表明促炎M1型小胶质细胞加重神经元损伤, 而PDA/Gel处理的BV2-M1细胞显著逆转了OGD/R模型引起的HT22细胞的活力降低。此外, TUNEL染色表明, PDA/Gel处理的BV2-M1细胞显著抑制HT22细胞在OGD/R模型中的凋亡。这些结果表明, PDA/Gel可将小胶质细胞从促炎表型转变为抗炎表型, 并在缺血再灌注后辅助神经保护。

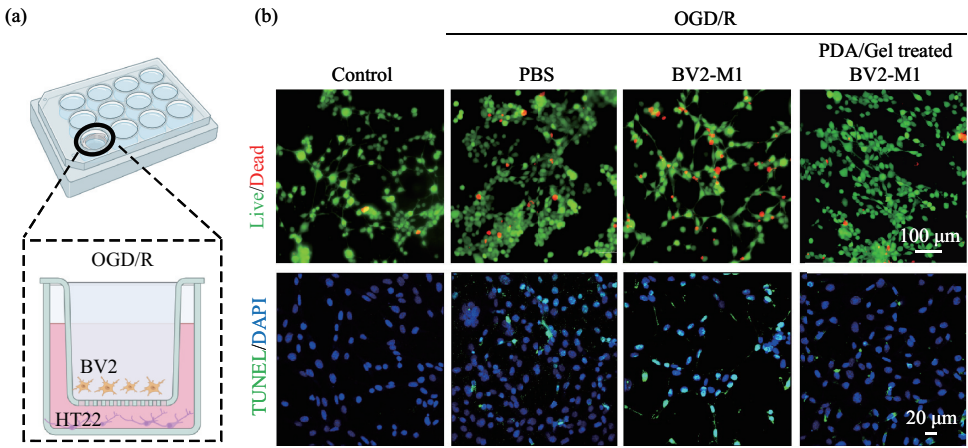


Fig. 6 Polarized M2-type microglia can protect damaged neurons in the OGD/R model

(a) Schematic diagram of Transwell co-culture design, illustrating the interaction between BV-2 cells (upper chamber) and HT22 cells (lower chamber). This schematic was created using BioRender.com. (b) Representative images of live/dead cell staining and TUNEL apoptosis cell staining for co-cultured BV-2 cells and HT22 cells.

3 讨 论

在某些大脑缺血损伤疾病中, 受损区域产生大量ROS和炎症介质, ROS在炎症级联反应初期可以加重氧化损伤^[19-20]。因此, 在有效时间窗内清除炎症微环境中的ROS对阻断炎症的发展至关重要。已有研究证实了聚多巴胺纳米系统序贯治疗IS的作用^[21], 并在体内体外验证了其优越的抗氧化及组织修复性能, 但其对脑损伤部位的靶向性以及有效时间窗发挥作用的可控性仍有待验证。基于此, 本研究设计并制备了一种ROS响应型、可原位注射的水凝胶纳米颗粒递送系统, 其可以响应受损微环境中存在的过量ROS并按需释放具备优越的抗氧化性能的PDA NPs, 清除过剩的ROS, 恢复炎症微环境中的细胞稳态, 减轻氧化应激导致的损伤。

为赋予水凝胶ROS响应性能, 本文以苯硼酸 (phenylboronic acid, PBA) 与PVA的顺式二醇动态共价交联为基础, 构建硼酸酯网络^[22]。该交联兼具pH与ROS双重敏感性: 炎症灶内pH降低可加速硼酸酯水解, 而局部过表达的ROS则通过配位-氧化机制直接切断B—C键, 生成苯酚与硼酸, 实现按需断裂^[23]。在模拟炎症微环境的释放实验中, 证明水凝胶可以有效响应环境中的ROS, 缓释纳米颗粒。为了系统验证负载PDA NPs的水凝胶在氧化应激微环境中的抗氧化性能, 首先以PDA NPs为切入点, 定量评估其对3种代表性ROS ($O_2^{\cdot-}$ 、 $\cdot OH$ 、 H_2O_2) 的清除效率。结果显示, PDA NPs在50~200 mg/L范围内呈典型剂量-效应关系, 对 $\cdot OH$ 的清除率最高可达60%以上。对于该水凝胶系统, 通过DPPH试剂盒检测了其抗氧化能力, 与PVA及空水凝胶组相比, 负载PDA NPs的水凝胶抗氧化性能更加优越。综上, 硼酸酯交联水凝胶

可精准感知病灶 ROS 水平并完成脉冲式药物递送和清除 ROS, 为炎症靶向治疗提供时空可控的载体平台。

对于可注射的水凝胶药物递送系统, 适当的交联程度和机械强度是至关重要的^[24-25]。由于鼠脑模量较低 (100~1 000 Pa), 与其力学性能相匹配的水凝胶是首选。流变学检测表明, 水凝胶的储能模量大于损耗模量, 且 3 种水凝胶的储能模量在 1 000 Pa 以下, 可以减少对周围健康组织的挤压与异物反应。值得注意的是, 检测在不同剪切速率下水凝胶黏度的变化, 结果表明, 随着剪切速率的增大, 水凝胶黏度降低, 表现出剪切稀化的特性, 利于在脑内的原位注射^[26]。

在体外细胞实验中, 构建 OGD/R 模型, 评估该水凝胶系统对该模型下的神经元的保护作用。实验结果表明, 其可以通过清除炎性微环境中的 ROS 来保护神经元免受 ROS 的攻击, 这一现象可能源于 PDA 纳米颗粒通过调节 Bcl-2、Bax 的表达来减少神经元的凋亡^[21]。小胶质细胞是中枢神经系统中驻留的重要免疫细胞, M1 型小胶质细胞主要诱导炎症反应, 释放促炎细胞因子和趋化因子等, M2 型小胶质细胞发挥抗炎和修复功能, 释放抗炎细胞因子、神经营养因子等, 有助于减轻神经炎症和促进组织修复^[27]。研究该水凝胶系统对小胶质细胞的调控作用, 结果显示, 其可以促进小胶质细胞向抗炎 M2 型转型, 同时降低促炎细胞因子 (IL-6、IL-1 β 及 TNF- α) 的表达, 从而影响下游信号通路^[28]。为了研究极化后的小胶质细胞对受损神经元是否有保护作用, 进行 Transwell 共培养^[29]。实验结果显示, 经水凝胶预处理的小胶质细胞使神经元凋亡显著减少。根据先前神经元与小胶质细胞相互作用的研究^[30], 推测对神经元活性进行调控存在多种机制, 其中神经免疫调控发挥重要作用。可能是由于 PDA NPs 介导的 M2 型小胶质细胞分泌 IL-10、TGF- β 通过作用于神经元 IL-10R/TGF- β R, 激活 PI3K-Akt 通路, 增强抗凋亡蛋白 Bcl-xl 表达发挥作用^[31], 具体机制有待进一步验证。上述体外研究表明, 负载 PDA NPs 的 ROS 响应型水凝胶可以通过“ROS 清除-小胶质细胞转型-抗神经元凋亡”闭环, 重塑神经免疫微环境, 为创伤、缺血或退行性病变提供时空可控的抗氧化、抗炎并进一步促进神经再生的微环境。

4 结 论

本文研究了一种可注射的负载 PDA NPs 的 ROS 响应型水凝胶, 通过交联 TSPBA 和 PVA 制备水凝胶, 并将 PDA NPs 掺入水凝胶基质中, 得到能感知 ROS 信号并按需协同调控的智能抗氧化水凝胶。该水凝胶表现出优异的 ROS 响应性和抗氧化性, 可同时在体外实验中发挥抗炎和神经保护作用, 为聚多巴胺等生物活性材料的递送提供了有前景的策略, 其可注射性也为大脑原位注射治疗炎症相关疾病和创伤性疾病的潜在应用奠定了基础。在后续的实验研究中还应对该水凝胶进行更为完善的体内实验验证, 例如建立大脑中动脉栓塞再灌注动物模型, 研究其在体内的神经保护和抗炎作用, 为进一步临床转化提供可靠依据。

数据可用性声明 本篇论文的关联数据 (DOI: 10.57760/sciencedb.36743/CSTR: 31253.11. sciencedb.36743) 可在科学数据银行 (Science Data Bank, ScienceDB) 数据库 (<https://www.scidb.cn/s/bArQBr>) 中依申请访问获取。

参 考 文 献

- [1] Meng X, Zheng Z, Yang L, *et al.* Dynamic mechanisms and targeted interventions in cerebral ischemia - reperfusion injury: pathological cascade from ischemia to reperfusion and promising therapeutic strategies. *Front Neurosci*, 2025, **19**: 1649533
- [2] Chan T Y H, De Yu Ma B, Hung T K, *et al.* Microglial polarization and therapeutic strategies in post-stroke neuroinflammation. *Neurol Ther*, 2025, **14**(6): 2277-2293
- [3] Chen A Q, Fang Z, Chen X L, *et al.* Microglia-derived TNF- α mediates endothelial necroptosis aggravating blood brain-barrier disruption after ischemic stroke. *Cell Death Dis*, 2019, **10**: 487
- [4] Shichita T, Ooboshi H, Yoshimura A. Neuroimmune mechanisms and therapies mediating post-ischaemic brain injury and repair. *Nat Rev Neurosci*, 2023, **24**(5): 299-312
- [5] Jiang X, Stockwell B R, Conrad M. Ferroptosis: mechanisms, biology and role in disease. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2021, **22**(4): 266-282
- [6] Rotaru-Zăvăleanu A D, Dinescu V C, Aldea M, *et al.* Hydrogel-based therapies for ischemic and hemorrhagic stroke: a comprehensive review. *Gels*, 2024, **10**(7): 476
- [7] Gao Y, Zhang T L, Zhang H J, *et al.* A promising application of injectable hydrogels in nerve repair and regeneration for ischemic stroke. *Int J Nanomed*, 2024, **19**: 327-345

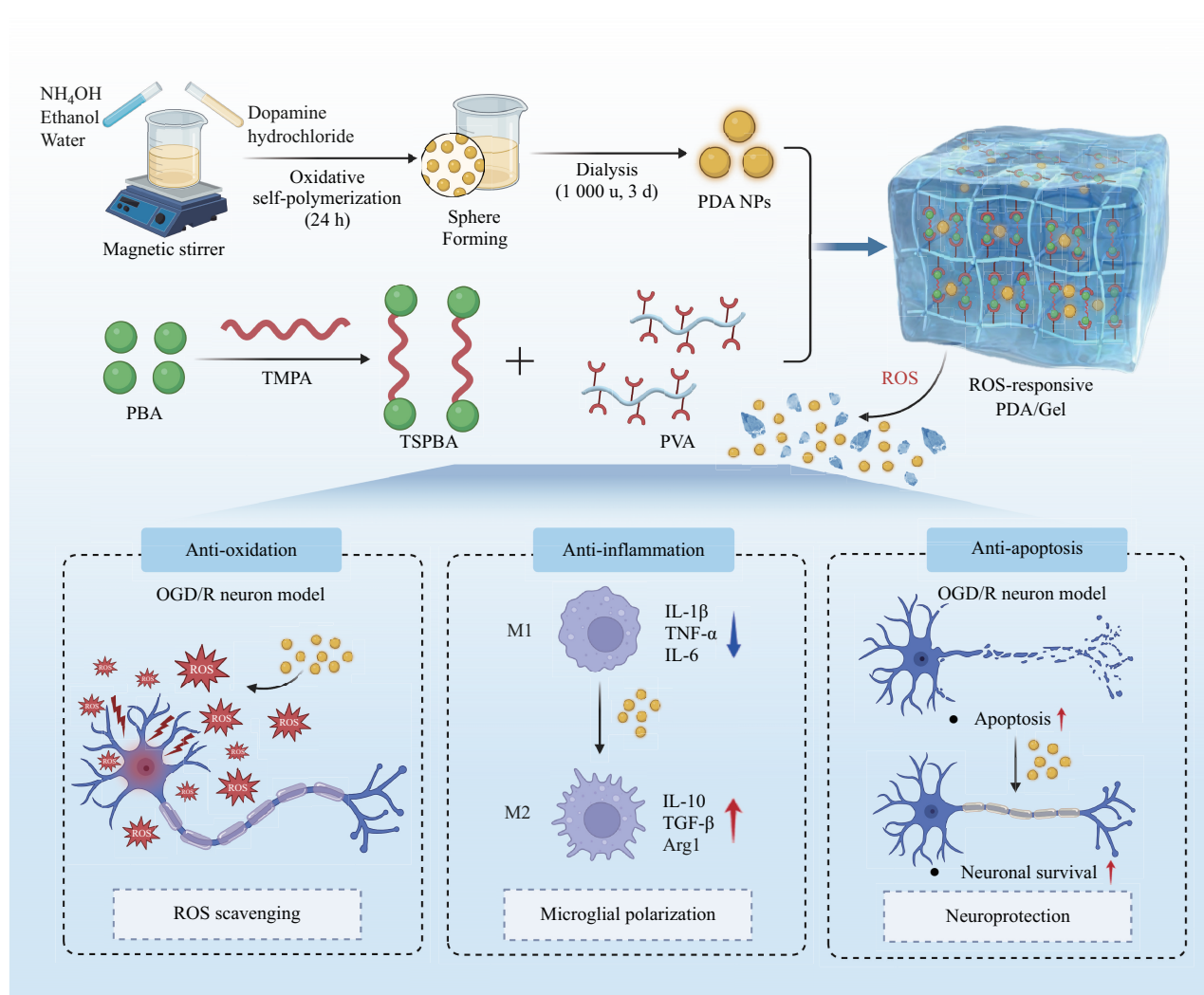
- [8] Zhao L, Chen S, Chen S, *et al.* Self-regulating hydrogel for diabetic wound healing: from animal models to a pilot clinical study. *Sci Adv*, 2026, **12**(14): ead4981
- [9] Pu M, Cao H, Zhang H, *et al.* ROS-responsive hydrogels: from design and additive manufacturing to biomedical applications. *Mater Horiz*, 2024, **11**(16): 3721-3746
- [10] Xu Y, Huang R, Shi W, *et al.* ROS-responsive hydrogel delivering METRNL enhances bone regeneration *via* dual stem cell homing and vasculogenesis activation. *Adv Healthc Mater*, 2025, **14**(16): 2500060
- [11] Tian X, Wen Y, Zhang Z, *et al.* Smart multifunctional ROS-responsive supramolecular hydrogel for simultaneously regulating oxidative stress, immune dysregulation, and bacterial infection in diabetic wound healing. *Biomaterials*, 2026, **330**: 124006
- [12] Wang W, Zhang X, Zhang L, *et al.* An immunomodulating regenerating hydrogel that rescues the oxidative microenvironment and reverses cell senescence for osteoporotic bone defects. *ACS Nano*, 2025, **19**(31): 28353-28371
- [13] Wang L, Yu C, You T, *et al.* Injection of ROS-responsive hydrogel loaded with IL-1 β -targeted nanobody for ameliorating myocardial infarction. *Bioact Mater*, 2025, **46**: 273-284
- [14] Tang Z, Xu Y, Li J, *et al.* Multifunctional hydrogel adhesive accelerates hemostasis and wound healing with combined programmatic photothermal property and reactive oxygen species-scavenging ability. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2025, **17**(28): 40208-40225
- [15] He S, Long L, Liu W, *et al.* A redox-active and electroactive hydrogel enabled by an integrated PEDOT@PMOF nanofiller for post-infarct myocardial repair. *Adv Sci*, 2025, **12**(43): e05612
- [16] Zhang T, Liu P, Shen W, *et al.* DNase I-mediated chemotactic nanoparticles for NETs targeting and microenvironment remodeling treatment of acute ischemic stroke. *Adv Sci*, 2025, **12**(34): e03689
- [17] Liu Y, Ai K, Ji X, *et al.* Comprehensive insights into the multi-antioxidative mechanisms of melanin nanoparticles and their application to protect brain from injury in ischemic stroke. *J Am Chem Soc*, 2017, **139**(2): 856-862
- [18] Yin N, Zhao Y, Liu C, *et al.* Engineered nanoerythrocytes alleviate central nervous system inflammation by regulating the polarization of inflammatory microglia. *Adv Mater*, 2022, **34**(27): 2201322
- [19] Dong X, Jiang D, Chen S, *et al.* KNC nanozyme repairs hypoxia ischemia brain damage through ALOX12 mediated lipid peroxidation inhibition. *Bioact Mater*, 2025, **54**: 531-548
- [20] Qi Y, Wang C, Miao Y, *et al.* Iron oxide nanozyme as reactive oxygen and nitrogen species scavenger to regulate microglial homeostasis in stroke. *Adv Sci*, 2026, **13**(18): e18191
- [21] Wu D, Zhou J, Zheng Y, *et al.* Pathogenesis-adaptive polydopamine nanosystem for sequential therapy of ischemic stroke. *Nat Commun*, 2023, **14**: 7147
- [22] Yang J, Wang J, Zeng Z, *et al.* Injectable sustained-release danshensu sodium-loaded nanoparticle hydrogel targets macrophages to improve myocardial microenvironment for myocardial infarction treatment. *Bioact Mater*, 2025, **54**: 159-178
- [23] Graham B J, Windsor I W, Gold B, *et al.* Boronic acid with high oxidative stability and utility in biological contexts. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2021, **118**(10): e2013691118
- [24] Zhang W, Liu Y, Wang Z, *et al.* Remodeling brain pathological microenvironment to lessen cerebral ischemia injury by multifunctional injectable hydrogels. *J Control Release*, 2024, **369**: 591-603
- [25] Huang T, Xu H G, Jiao K X, *et al.* A novel hydrogel with high mechanical strength: a macromolecular microsphere composite hydrogel. *Adv Mater*, 2007, **19**(12): 1622-1626
- [26] Nih L R, Gojini S, Carmichael S T, *et al.* Dual-function injectable angiogenic biomaterial for the repair of brain tissue following stroke. *Nat Mater*, 2018, **17**(7): 642-651
- [27] Depp C, Doman J L, Hingerl M, *et al.* Microglia transcriptional states and their functional significance: context drives diversity. *Immunity*, 2025, **58**(5): 1052-1067
- [28] Li X, Han Z, Wang T, *et al.* Cerium oxide nanoparticles with antioxidative neurorestoration for ischemic stroke. *Biomaterials*, 2022, **291**: 121904
- [29] Yuan J, Li L, Yang Q, *et al.* Targeted treatment of ischemic stroke by bioactive nanoparticle-derived reactive oxygen species responsive and inflammation-resolving nanotherapies. *ACS Nano*, 2021, **15**(10): 16076-16094
- [30] Asimakidou E, Pluchino S, Silva B A, *et al.* The metabolic engine of cognition: microglia – neuron interactions in health, ageing and disease. *Nat Metab*, 2025, **7**(12): 2395-2413
- [31] Vasudevan Sajini D, Thaggikuppe Krishnamurthy P, Chakkittukandiyil A, *et al.* Orientin modulates Nrf2-ARE, PI3K/Akt, JNK-ERK1/2, and TLR4/NF-kB pathways to produce neuroprotective benefits in Parkinson's disease. *Neurochem Res*, 2024, **49**(6): 1577-1587

In Vitro* Study of ROS-responsive Hydrogel Loaded With Polydopamine Nanoparticles for Neuronal Protection by Regulating Inflammatory Microenvironment

XIAO Yang, LIU Wei, SUN Tian-Yi, SHA Chuan-Lu, WANG Chun-Lan, WANG Chang-Yong**

(Academy of Military Medical Sciences, Academy of Military Sciences, Beijing 100850, China)

Graphical abstract



* This work was supported by grants from the STI 2030-Major Projects (2021ZD0201600, 2021ZD0201604).

** Corresponding author.

Tel: 86-10-66931377, E-mail: wcy2000_zm@163.com

Received: February 26, 2026 Accepted: May 14, 2026

Abstract Objective Cerebral ischemic injury triggers a complex pathological cascade characterized by excessive reactive oxygen species (ROS) accumulation, persistent oxidative stress, and sustained neuroinflammation in the injured brain microenvironment. These events collectively drive mitochondrial dysfunction, microglial overactivation, pro-inflammatory cytokine release, and progressive neuronal apoptosis, ultimately leading to severe and irreversible neurological deficits. However, conventional therapeutic strategies face critical limitations, including poor blood-brain barrier penetration, insufficient local drug concentration, uncontrolled drug release, and off-target systemic side effects. To address this pathological process, we rationally designed and fabricated an injectable ROS-responsive hydrogel loaded with polydopamine nanoparticles (PDA NPs) for spatiotemporally controlled antioxidation, anti-inflammation, and neuroprotection in the ischemic injury microenvironment. The present study aimed to systematically characterize the physicochemical properties, ROS-responsive drug release behavior, biocompatibility, and neuroprotective efficacy of this composite hydrogel system *in vitro*. **Methods** PDA NPs were fabricated *via* oxidative self-polymerization. The ROS-responsive hydrogel was cross-linked using N1-(4-boronobenzyl)-N3-(4-boronophenyl)-N1,N1,N3,N3-tetramethylpropane-1, 3-diaminium (TSPBA) and polyvinyl alcohol (PVA). Morphology, particle size, Zeta potential, and structure of PDA NPs were characterized by dynamic light scattering (DLS), Zeta potential analysis, scanning electron microscopy (SEM), and transmission electron microscopy (TEM). Microstructure, rheological properties, shear-thinning behavior, and ROS-triggered release profiles of the hydrogel were examined by SEM and rheometry. Biocompatibility was evaluated using HT22 mouse hippocampal neurons with CCK-8 and live/dead staining. An oxygen-glucose deprivation/reoxygenation (OGD/R) model was established to simulate ischemic injury *in vitro*. ROS levels and neuronal apoptosis were detected by DHE staining and TUNEL assay. Microglial polarization and pro-inflammatory cytokine expression were analyzed using immunofluorescence and RT-qPCR in BV-2 microglia. Transwell co-culture was used to verify the indirect neuroprotection mediated by modulated microglia. **Results** Characterization results confirmed that the as-prepared PDA NPs were monodispersed spherical nanoparticles with uniform diameter and negative surface potential, demonstrating favorable dispersibility and robust ROS-scavenging activity. The TSPBA-PVA hydrogel exhibited a highly porous interconnected network, suitable mechanical strength, and obvious shear-thinning behavior, supporting its application as an injectable implant. More importantly, the hydrogel displayed typical ROS-responsive degradation and on-demand PDA NP release in a ROS-concentration-dependent manner. *In vitro* cellular experiments demonstrated that the PDA NP-loaded hydrogel possessed excellent biocompatibility with HT22 cells. In the OGD/R model, the hydrogel significantly reduced intracellular ROS accumulation and markedly suppressed neuronal apoptosis. Furthermore, the composite hydrogel effectively redirected BV-2 microglia from the pro-inflammatory M1 toward the anti-inflammatory M2 phenotypes, downregulated the expression of pro-inflammatory cytokines including TNF- α , IL-1 β , and IL-6, and reduced inflammatory damage. Transwell co-culture assays further validated that M2-polarized microglia mediated by the hydrogel significantly enhanced the survival of OGD/R-injured HT22 neurons and attenuated apoptosis. **Conclusion** In this study, we successfully developed a novel injectable ROS-responsive hydrogel loaded with PDA NPs for synergistic antioxidative and anti-inflammatory neuroprotection. This intelligent hydrogel system enables ROS-triggered on-demand release of PDA NPs, efficiently scavenges excessive ROS, inhibits oxidative stress injury, modulates microglial polarization, and suppresses neuroinflammation, thereby exerting robust neuroprotective effects *in vitro*. This biomaterial platform provides a promising strategy for the targeted and controlled delivery of bioactive nanomaterials in the central nervous system diseases and establishes a solid experimental foundation for the development of *in situ* injectable therapies for ischemic brain injury.

Key words ROS-responsive hydrogel, polydopamine, immune inflammatory microenvironment, neuroprotection

DOI: 10.3724/j.pibb.2026.0094

CSTR: 32369.14.pibb.20260094