



重组高密度脂蛋白负载金线莲苷增强小胶质细胞 β 淀粉样蛋白吞噬能力并改善炎症水平*

陈璐瑶¹⁾ 穆 岩²⁾ 华 茜^{1)**}⁽¹⁾ 北京中医药大学生命科学学院, 北京 102400; ⁽²⁾ 北京中医药大学中医学院, 北京 102400

摘要 目的 本研究旨在以重组高密度脂蛋白(rHDL)为载体包载金线莲苷(KD), 探究负载金线莲苷的重组高密度脂蛋白(KD@rHDL)增强小胶质细胞吞噬 β 淀粉样蛋白(A β)能力并改善小胶质细胞炎症状态的功能。方法 使用薄膜水化法制备KD@rHDL并表征其粒径、电位、包封率、载药量及其形态, 通过表面等离子共振实验(SPR)验证KD@rHDL对A β 的亲合力。将KD@rHDL给予小胶质细胞, 通过荧光标记验证KD@rHDL增强A β 吞噬的作用, 通过蛋白质印迹法(Western blot)验证NLRP3与IL-1 β 的表达变化。结果 表征数据显示, KD@rHDL在电镜下呈现盘状结构, 具备适宜的粒径和电位, 载药量和包封率良好。CCK-8实验显示, KD@rHDL具有良好的安全性。小胶质细胞A β 吞噬实验表明, KD@rHDL可以增强小胶质细胞对A β 的吞噬作用。SPR实验表明, 高密度脂蛋白与A β 具有高亲和力, 可以作为促进小胶质细胞吞噬A β 的媒介。蛋白质印迹法结果表明, KD@rHDL可以降低NLRP3与IL-1 β 表达, 改善小胶质细胞炎症状态。结论 KD@rHDL通过增加小胶质细胞吞噬A β 能力并调节NLRP3与IL-1 β 水平, 表现出对阿尔茨海默病(AD)的治疗潜力。

关键词 阿尔茨海默病, 重组高密度脂蛋白, 金线莲苷, β 淀粉样蛋白, 白介素-1 β , NLRP3炎症小体

中图分类号 Q819, R741

DOI: 10.3724/j.pibb.2026.0095

CSTR: 32369.14.pibb.20260095

全球约有2 400万人患有痴呆症, 其中约60%为阿尔茨海默病(Alzheimer's disease, AD), 造成了严重的公共卫生问题^[1]。2005年, AD国际组织召集了一个国际痴呆专家小组, 开展基于证据的德尔菲全球痴呆患病率研究。德尔菲研究估计, 2001年全球有2 430万痴呆患者, 并预测这一数字在2040年将达到8 110万。受影响人数最多的国家或地区为中国及发展中西太平洋地区、西欧和美国^[2]。尽管临床已获批多种药物缓解AD症状, 但尚未有治愈药物出现, 因此迫切需要加深对发病机制的理解, 开发新的治疗策略。近期的流行病学系统综述提供了痴呆患病率的全面估计。世界卫生组织的一份报告估计, 痴呆症占60岁以上人群残废生活的11.2%——高于中风、心血管疾病和癌症^[3]。

AD的两个核心病理特征是淀粉样斑块和神经原纤维缠结。淀粉样蛋白级联假说表明, β 淀粉样蛋白(amyloid β -protein, A β)的沉积会引发大脑中的神经功能障碍和死亡^[4]。小胶质细胞是脑部

常驻的骨髓细胞, 具有介导中枢神经系统的关键功能^[5]。小胶质细胞表达多种受体, 这些受体作为分子传感器, 识别外源性或内源性中枢神经系统损伤并启动免疫反应。急性激活的小胶质细胞表达细胞因子, 推动增强吞噬作用、吸收和清除A β ^[6]。然而, 小胶质细胞的长期活化不仅推动增殖, 还会引发慢性炎症状态, 导致神经毒性和神经退行性疾病^[7]。慢性炎症和A β 积累是AD的临床常见特征。小胶质细胞的长期激活通过触发多个促炎级联反应, 促进神经毒性和突触丧失^[8]。

脂蛋白是由蛋白质和脂质组成的分子复合体。成熟脂蛋白颗粒的一般球形结构由内部疏水核心和外部亲水壳组成^[9]。多条证据线索, 包括多项大规模人体临床研究, 显示高密度脂蛋白(high-density lipoprotein, HDL)水平与AD之间存在强

* 国家自然科学基金(U21A20414, U25A20613)资助项目。

** 通讯联系人。

Tel: 010-64286498, E-mail: hqianz@aliyun.com

收稿日期: 2026-02-26, 接受日期: 2026-05-20

有力的联系^[10]。HDL及其模拟肽通过调节小胶质细胞脂代谢、抑制神经炎症,并直接结合A β 促进其解聚,从而增强小胶质细胞对A β 的吞噬与清除能力,靶向AD核心病理^[11]。已有研究表明,一种载有姜黄素的重组高密度脂蛋白(reconstituted high-density lipoprotein, rHDL),可以通过减轻神经炎症和改善突触功能,显著改善AD模型小鼠的认知障碍。还有研究探讨了载脂蛋白A-I(apolipoprotein A-I, ApoA-I)模拟肽通过增强自噬-溶酶体途径,促进小胶质细胞对A β 的降解并抑制其聚集^[12]。

金线莲苷是名贵中药金线莲中关键的活性成分,属于黄酮苷类化合物。其主要药理活性包括抗炎、抗氧化、保肝以及免疫调节等,在代谢性疾病和炎症相关疾病的治疗中显示出良好潜力^[13]。金线莲苷可显著延长秀丽隐杆线虫的平均寿命。此外,它提升了秀丽隐杆线虫的生理功能、抗应激能力和体内抗氧化活性。进一步研究表明,金线莲苷可通过调控秀丽隐杆线虫CL4176中应激响应和自噬相关基因,对A β 诱导的蛋白质毒性具有保护作用^[14]。金线莲苷还可显著改善AD模型小鼠认知功能。其核心机制在于通过抑制 γ 干扰素(interferon- γ),扩张脑膜淋巴管,增强大脑类淋巴系统的废物清除能力,从而促进了A β 的清除,并最终改善认知功能^[15]。

本研究构建了一种rHDL负载金线莲苷的纳米药物。该体系拟利用rHDL与AD核心病理蛋白A β 的高亲和力^[16],实现主动靶向识别并富集于A β 沉积区域,依托其可被脑内常驻免疫细胞——小胶质细胞高效吞噬的特性,增强对A β 的清除效能。在AD发生发展过程中,小胶质细胞处于功能失衡状态,不仅A β 清除能力受损,还伴随持续性促炎表型激活,加剧神经炎症损伤^[17]。核苷酸结合结构域富含亮氨酸重复序列和含热蛋白结构域受体3(nucleotide-binding domain leucine-rich repeat and pyrin domain-containing receptor 3, NLRP3)炎症小体是介导小胶质细胞炎症反应的核心分子^[6]。在AD病理条件下,A β 沉积可激活小胶质细胞中的NLRP3炎症小体,促进胱天蛋白酶1(cysteine aspartic acid specific protease 1, caspase-1)活化和白介素(interleukin, IL)-1 β 、IL-18等促炎因子的成熟与释放,进而加剧神经炎症和神经元损伤^[18]。研究表明,抑制NLRP3活化可减轻AD模型小鼠的神经炎症并改善认知功能^[12]。因此,本研究选择

NLRP3作为评估rHDL负载金线莲苷调控小胶质细胞炎症反应的关键指标。同时,本研究将具有明确抗炎、抗氧化活性的天然活性成分金线莲苷负载于rHDL载体中,旨在实现金线莲苷向活化小胶质细胞的精准递送,从而协同调节其功能:一方面增强其对A β 的清除能力,另一方面抑制其过度炎症反应,恢复小胶质细胞稳态。体外细胞实验结果表明,该纳米制剂可显著改善脂多糖诱导的小胶质细胞炎症状态,表现为炎症因子表达下调。KD@rHDL作为一种兼具A β 清除与免疫调节功能的仿生纳米递送系统,为AD的多靶点干预策略提供了新思路。

1 材料与方法

1.1 实验材料

二肉豆蔻酰基卵磷脂(1,2-dimyristoyl-sn-glycero-3-phosphocholine, DMPC)与胆固醇购自Sigma公司;apoA-I模拟肽(PVLDFRELLNELLEALKQKLK)购自强耀生物科技有限公司;3%磷钨酸溶液购自伊诺凯科技有限公司;PBS购自塞维尔生物有限公司,A β 多肽购自吉尔生化有限公司,BV2细胞购自上海泽叶生物科技有限公司;CCK-8试剂盒购自北京拜尔迪生物技术有限公司;IL-1 β 抗体(ABclonal, A22257)购自武汉爱博泰克生物科技有限公司、NLRP3抗体(Cell Signaling Technology, D4D8T)购自赛信通上海生物试剂有限公司和 β -actin(Proteintech, 60008-1-Ig)购自武汉三鹰生物技术有限公司;氯仿购自北京市通广精细化工公司;甲醇购自伊诺凯科技有限公司;200目碳支持膜购自北京中镜科仪技术有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 负载金线莲苷的高密度脂蛋白(KD@rHDL)的制备

采用薄膜水化法制备KD@rHDL:称取3 mg胆固醇,使用3 ml氯仿溶解得到1 g/L的胆固醇溶液。称取4 mg DMPC于50 ml圆底烧瓶中,加入10 ml氯仿与2.5 ml甲醇溶解,加入120 μ l 1g/L胆固醇溶液,置于旋转蒸发仪上抽真空旋蒸150 min,得到均匀脂膜。称取0.8 mg金线莲苷溶于4 ml 0.01 mol/L PBS溶液(pH7.4),将该金线莲苷溶液加入带脂膜的圆底烧瓶中,振荡使脂膜脱落分散,40 $^{\circ}$ C水浴超声1 h,200 W探头超声15 min得到包载金线莲苷的脂质体。称取1 mg apoA-I模拟肽溶

解于 1 ml 0.01 mol/L PBS 得到 1 g/L 的多肽溶液, 取 0.8 ml 加入到包载金线莲苷的脂质体溶液中, 孵育过夜得到包载金线莲苷的 rHDL, 命名为 KD@rHDL, 使用 10 ku 透析袋过夜透析纯化。为了制备 DiI 标记的 KD@rHDL, 在制备时向氯仿与甲醇相中加入 DiI (DMPC 质量的 2%), 其他步骤同上。

1.2.2 负载金线莲苷的高密度脂蛋白(KD@rHDL)的表征

粒径与电位: 将 KD@rHDL 用 PBS 稀释成 0.05 g/L 后使用马尔文粒径电位仪测定粒径与电位。取 0.05 g/L KD@rHDL 溶液 10 μ l 滴在 200 目碳支持膜上, 静置 10 min 后用吸水纸吸走溶液, 滴加 5 μ l 3% 磷钨酸溶液, 静置 2 min 后用吸水纸吸走溶液, 静置晾干, 使用日立 HT7700 透射电子显微镜观察 KD@rHDL 形态。

1.2.3 负载金线莲苷的高密度脂蛋白(KD@rHDL)的包封率与载药量检测

使用带有蒸发光散射检测器的高效液相系统检测金线莲苷浓度。使用 10 ku 超滤离心管将未透析的 KD@rHDL 溶液进行离心。流动相为 95% 水和 5% 甲醇, 金线莲苷的保留时间为 6.7 min。配制 0.2、0.1、0.05、0.025、0.012 5 g/L 金线莲苷溶液, 建立金线莲苷峰面积与浓度标准曲线, 收集下层不含 KD@rHDL 的溶液并检测其中金线莲苷浓度, 包封率计算公式为: 包封率 = (金线莲苷投料量 - 下层溶液金线莲苷含量) / 金线莲苷投料量; 载药量 = KD@rHDL 包载金线莲苷量 / (rHDL 质量 + KD@rHDL 包载金线莲苷量)。

1.2.4 细胞培养与传代

BV2 和 bEnd.3 细胞采用含 10% 胎牛血清的 DMEM 高糖培养基, HT22 细胞采用含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基, 于 37°C、5% CO₂ 条件下恒温培养。待细胞密度达 80% 时, 使用胰蛋白酶消化, 按 1 : 3 比例进行接种传代。

1.2.5 细胞毒性实验

BV2 和 HT22 细胞毒性实验采用 CCK-8 法进行。将处于对数生长期的 BV2 和 HT22 细胞以 0.5×10^4 个/孔的密度接种于 96 孔板, 待细胞贴壁后, 更换为分别含有 5、10、25、50、100、200 和 400 mg/L KD@rHDL 的新鲜培养基, 并设置空白对照组与溶剂对照组。药物作用 24 h 后, 加入 CCK-8 溶液 10 μ l/孔, 继续孵育 2 h。最后, 使用酶标仪在 462 nm 波长处测定各孔的吸光度值, 根据公式计

算细胞存活率以评估药物毒性。

1.2.6 细胞摄取实验

在 24 孔板中放入细胞玻片, 取对数生长期的 BV2 细胞, 以 4×10^4 /孔的细胞密度接种到 24 孔板, 置于 37°C、5% CO₂ 培养箱中过夜孵育。次日更换新鲜完全培养基, 分别设置空白对照组, A β 组, A β +KD@rHDL 组, 每组设 3 个复孔。空白对照组更换完全培养基, A β 组更换等量含 2 mg/L A β 聚集体的完全培养基, A β +KD@rHDL 组更换含 2 mg/L A β 聚集体并同时给予 KD@rHDL, 孵育 6 h 后, 吸弃培养基, 用 PBS 清洗细胞 2 次, 使用 4% 多聚甲醛固定细胞 10 min, 固定后用 DAPI 染色 10 min, 清洗 2 次后在载玻片上滴加封片剂进行封片。在奥林巴斯 FV3000 激光共聚焦显微镜下观察细胞对 A β 的吞噬情况。

1.2.7 A β 单体及聚集体制备

取 A β 1-42 溶于 100 μ l 六氟异丙醇 (hexafluoroisopropanol, HFIP) 中, 用氮气流吹干 HFIP, 加 DMSO 溶解 A β 1-42 浓度为 5 mmol/L, 水浴超声 10 min 得到 A β 1-42 单体。取 20 μ l A β 1-42 单体 DMSO 溶液 (5 mmol/L), 加入 980 μ l PBS 溶液稀释到 100 μ mol/L, 4°C 孵育 24 h, 即得 A β 1-42 寡聚体 (A β o)。

1.2.8 Transwell实验

将 bEnd.3 细胞, 以 1×10^5 /孔的密度接种于 Transwell 小室 (孔径 0.4 μ m,) 的上室, 下室加入 600 μ l 培养基。每 2 天更换一次培养基, 连续培养 5 d 至细胞形成致密单层。第 3 天的时候, 在 24 孔板中放入细胞玻片, 将 BV2 小胶质细胞或 HT22 海马神经元细胞以 0.5×10^5 /孔的密度接种于 24 孔板中, 加入 500 μ l 完全培养基, 置于 37°C、5% CO₂ 培养箱中培养过夜。将 DiI 荧光染料 (1 g/L) 与 KD@rHDL (1 g/L) 按体积比 1 : 100 混合, 室温避光孵育 30 min。将 200 μ l DiI-KD@rHDL 以 100 mg/L 浓度加入上室, 下室加入 600 μ l 新鲜无血清 DMEM 培养基。于 37°C、5% CO₂ 培养箱中孵育 12 h。孵育结束后, 取出 Transwell 小室, 用 PBS 轻柔清洗下室细胞 2 次。下室细胞用 4% 多聚甲醛室温固定 10 min, 固定后用 DAPI 染色 10 min, 清洗两次后在载玻片上滴加封片剂进行封片。在奥林巴斯 FV3000 激光共聚焦显微镜下观察 BV2 小胶质细胞或 HT22 海马神经元细胞对 KD@rHDL 的摄取能力。

1.2.9 小胶质细胞KD@rHDL干预实验

将对数生长期的BV2接种于6孔板, 培养过夜至融合度达70%~80%。换培养基同步化处理24 h。实验分组: 空白对照组、脂多糖 (lipopolysaccharide, LPS) 模型组、KD@rHDL 低剂量组及KD@rHDL 高剂量处理组。除空白对照组外, 其余孔加入终浓度1 mg/L的脂多糖 (lipopolysaccharide, LPS) 共培养, KD@rHDL 低剂量组及KD@rHDL 高剂量处理组分别再加入10 mg/L和100 mg/L的KD@rHDL共培养24 h, 收集样品。

1.2.10 蛋白质印迹法

收集经处理的细胞后, 使用预冷的含有蛋白酶抑制剂 (Roche, cOmplete™) 和磷酸酶抑制剂 (Sigma, PhosSTOP™) 的RIPA裂解液在冰上充分裂解30 min, 随后于4°C、12 000 r/min条件下离心15 min, 收集上清液。采用碧云天BCA蛋白质浓度测定试剂盒测定样品浓度, 并根据结果将各组蛋白质浓度统一调整至一致。取等量蛋白质样品, 与5×SDS上样缓冲液混合, 煮沸变性后, 进行10% SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳分离。

电泳结束后, 采用湿式转印法, 在恒流条件下将蛋白转移至PVDF膜 (Millipore, 0.45 μm) 上。转印完毕后, 用含5%牛血清白蛋白的TBST封闭液在室温下缓慢摇动封闭2 h。封闭结束后, 将膜分别与以下特异性一抗在4°C下缓慢摇动孵育过夜: 兔源抗IL-1β抗体 (1:1 000稀释)、兔源抗NLRP3抗体 (1:1 000稀释), 以及作为内参的兔源抗β-actin抗体 (1:5 000稀释)。

次日, 用TBST洗膜6次, 5 min/次, 以充分去除未结合的一抗。随后, 将膜与相应的HRP标记山羊抗兔二抗 (Proteintech, 1:10 000稀释) 在室温下孵育1 h。孵育结束后, 再次用TBST彻底洗涤膜3次。最后, 使用雅酶超敏化学发光显影液均匀覆盖膜表面, 在Tanon 5200化学发光成像系统中进行曝光, 获取清晰的蛋白质条带图像, 并使用Image J软件对目标条带进行灰度值分析, 以β-actin作为内参对IL-1β及NLRP3的表达水平进行半定量分析。

1.2.11 数据分析

本研究中所有数据的统计处理均通过GraphPad Prism 9软件完成, 免疫荧光图片的量化分析则使用Image J软件进行。针对组间差异的比较, 具体统计方法如下: 多组间整体比较采用单因素方差分析。若分析结果显示组间总体存在显著差异, 则进一步使用Bonferroni校正法进行事后检

验, 以明确具体是哪些组别之间存在差异。两组间直接比较则采用 t 检验。统计显著性水平设定为 $\alpha=0.05$ 。当计算所得的 P 值小于0.05时, 认为组间差异具有统计学意义。

2 结 果

2.1 负载金线莲苷的高密度脂蛋白 (KD@rHDL) 的表征

rHDL的制备已有多篇文献报道^[19], 其中多肽来源可以分为血液提取与体外合成两种。考虑到血液提取步骤复杂且血液制品存在生物安全风险, 选择了体外合成的ApoA-I模拟肽 (图1a)。马尔文粒径电位仪测试结果显示制备的HDL粒径为 (14.4 ± 0.24) nm (图1b), ζ 电位为 (-3.35 ± 0.40) mV (图1c)。透射电镜下形态呈现堆叠的盘状结构 (图1d), 与以往报道形态类似。金线莲苷易溶于水、甲醇等, 难溶于氯仿、丙酮等, 因此将金线莲苷溶于水相中进行包载。使用HPLC-ELSD方法检测金线莲苷浓度并计算其载药量与包封率, 测试结果显示, 其载药量为 $(6.03\pm0.19)\%$ (图1e), 包封率为 $(42.24\pm1.30)\%$ (图1f)。综上, 金线莲苷被成功负载到rHDL中, 制备得到KD@rHDL。

2.2 负载金线莲苷的高密度脂蛋白 (KD@rHDL) 与Aβ的亲和力实验

本研究拟使用HDL作为媒介, 利用HDL与Aβ之间的亲和力以及小胶质细胞对HDL的摄取作用诱导小胶质细胞吞噬Aβ。本文通过SPR实验验证了KD@rHDL与Aβ单体及寡聚体的亲和力, 确保KD@rHDL具备作为Aβ与小胶质细胞媒介的能力。SPR实验结果表明, KD@rHDL与Aβ单体及寡聚体的亲和力常数分别为141 nmol/L与169 nmol/L (图2a, b), 说明由ApoA-I模拟肽与脂质制备得到的KD@rHDL具有结合Aβ单体及寡聚体的能力。

2.3 负载金线莲苷的高密度脂蛋白 (KD@rHDL) 促进小胶质细胞吞噬Aβ

SPR实验验证了KD@rHDL与Aβ具有良好的亲和力。本研究使用BV2小鼠小胶质细胞进行Aβ吞噬实验, TAMRA荧光标记的Aβ被用于制备Aβ₀, 并以2 mg/L的浓度单独或与rHDL或KD@rHDL一起给予BV2细胞进行细胞摄取实验。免疫荧光实验结果表明, 与单独的Aβ₀组相比, rHDL和KD@rHDL处理组都显著增加了小胶质细胞Aβ摄取量 (图3a, b), 且二者没有显著差异。

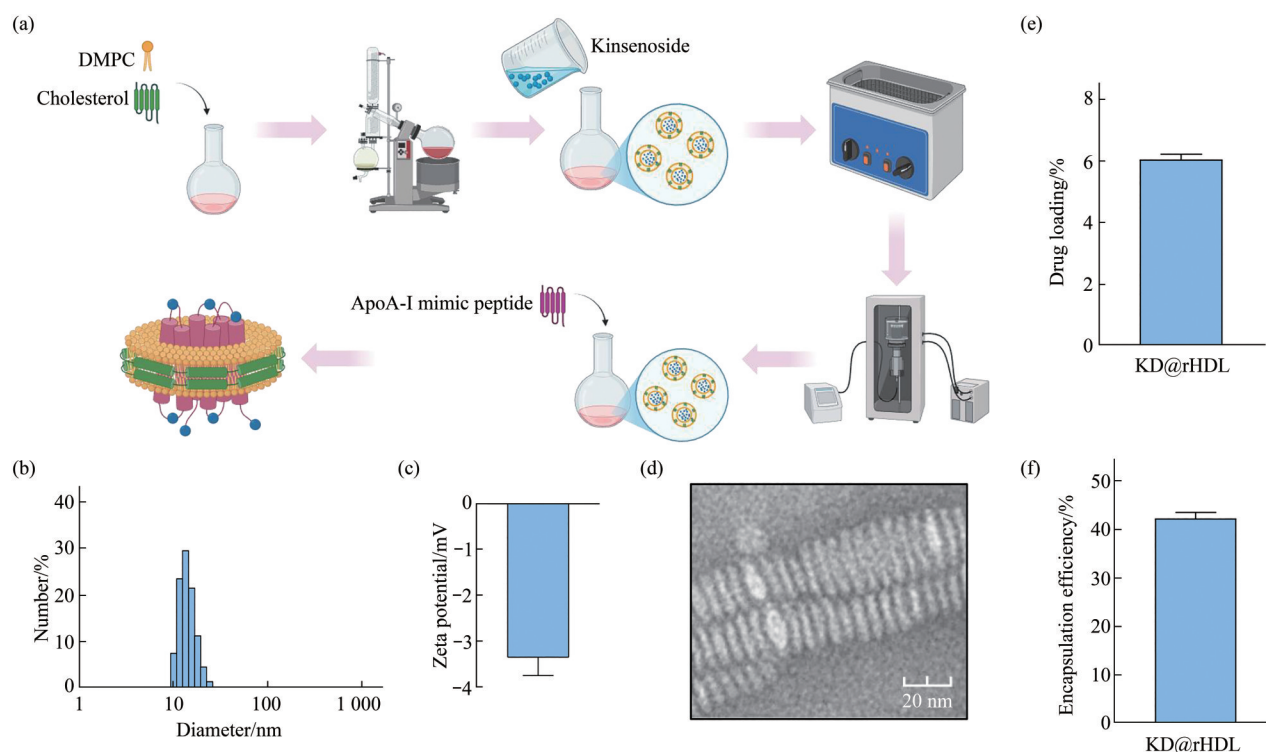


Fig. 1 Characterization of KD@rHDL

(a) Preparation of KD@rHDL. (b) The size of KD@rHDL. (c) The Zeta potential of KD@rHDL. (d) The morphology observed by transmission electron microscopy of KD@rHDL. (e) The drug loading capacity of KD@rHDL. (f) The encapsulation rate of KD@rHDL.

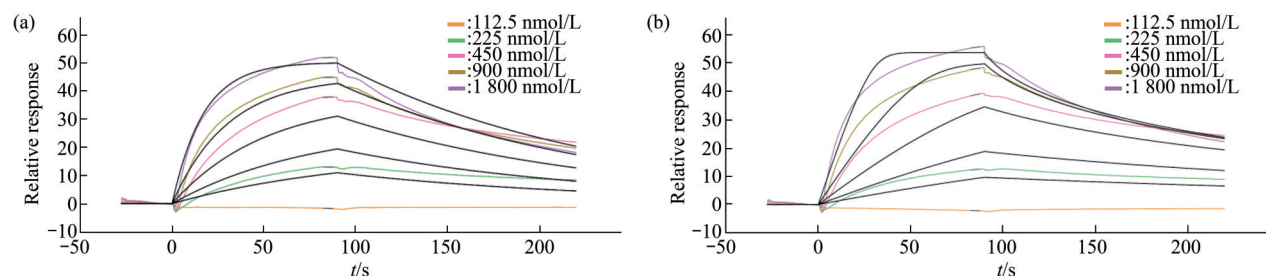


Fig. 2 Affinity curve of KD@rHDL with A β

(a) Affinity of KD@rHDL for A β monomers. (b) Affinity of KD@rHDL for A β oligomers.

2.4 负载金线莲苷的高密度脂蛋白 (KD@rHDL) 的细胞增殖毒性实验

为全面评估 KD@rHDL 的生物相容性及其对中枢神经系统细胞的潜在影响, 本研究在考察 BV2 小胶质细胞毒性的基础上, 进一步选用 HT22 小鼠海马神经元细胞系, 检测 KD@rHDL 对神经元细胞的细胞毒性。HT22 细胞是 AD 研究中常用的神经元模型, 评估其对神经元的毒性作用对于判断纳米药物的安全性具有重要意义。之所以选择海马神经元细胞, 是因为海马在 AD 中既是病理首发

部位, 又是症状的核心解剖基础。保护海马功能和延缓其萎缩, 是目前 AD 干预的核心目标之一。实验设置了不同浓度梯度的 KD@rHDL (0~400 mg/L) 处理细胞 24 h。结果显示, 在 0~400 mg/L 的浓度范围内, 不管是在 BV2 小胶质细胞中还是 HT22 神经元细胞中, 各处理组与对照组之间的细胞存活率均无统计学差异 ($P>0.05$) (图 4a, b), 表明 KD@rHDL 在该浓度下对小胶质细胞无明显毒性, 也表明 KD@rHDL 在常规药理浓度下具有良好的生物相容性。

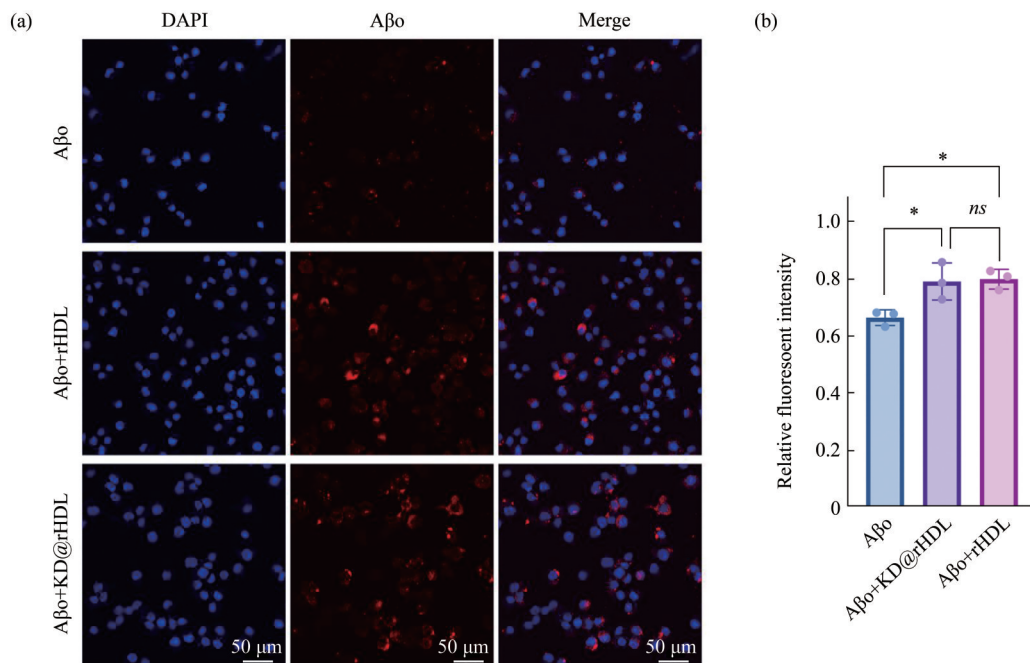


Fig. 3 Immunofluorescence and quantification of microglial phagocytosis of Aβ

Immunofluorescence (a) and quantification (b) of microglial phagocytosis of Aβ. The data are depicted as mean±SD, and statistical significance was evaluated through *t* test. **P*< 0.05, *ns*: not significant.

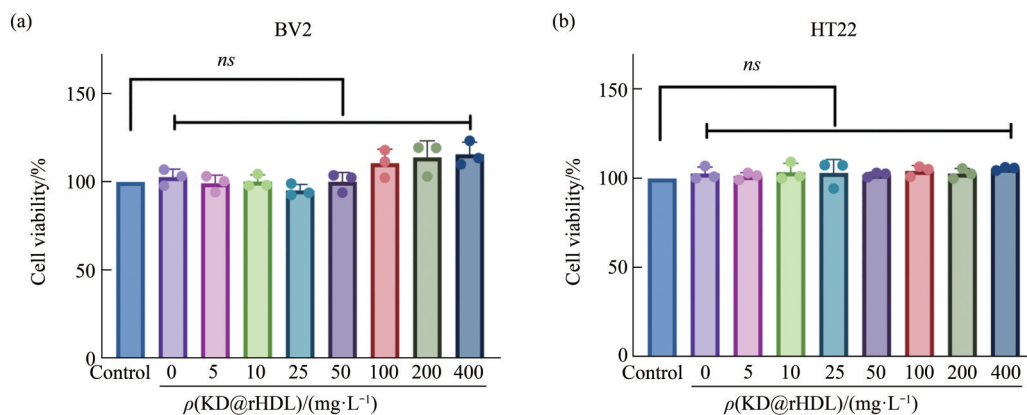


Fig. 4 Toxicity experiment of BV2 and HT22 with KD@rHDL

Toxicity experiment of BV2 (a) and HT22 (b) cells with KD@rHDL, The data are depicted as mean±SD, and statistical significance was evaluated using one-way ANOVA. *ns*: not significant.

2.5 负载金线莲苷的高密度脂蛋白 (KD@rHDL) 跨屏障转运的体外研究

采用 Transwell 共培养模型评价 DiI 标记的 KD@rHDL 跨屏障转运能力。激光共聚焦显微镜观察结果显示, 孵育 12 h 后, 下室 BV2 小胶质细胞和 HT22 海马神经元细胞内均可检测到明显的 DiI

红色荧光信号, 表明 KD@rHDL 能够有效跨过 bEnd.3 细胞单层屏障, 并被脑实质细胞摄取 (图 5a)。定量分析显示, KD@rHDL 处理组在 BV2 小胶质细胞和 HT22 海马神经元细胞中的荧光强度均显著高于空白对照组 (*P*<0.001) (图 5b, c)。

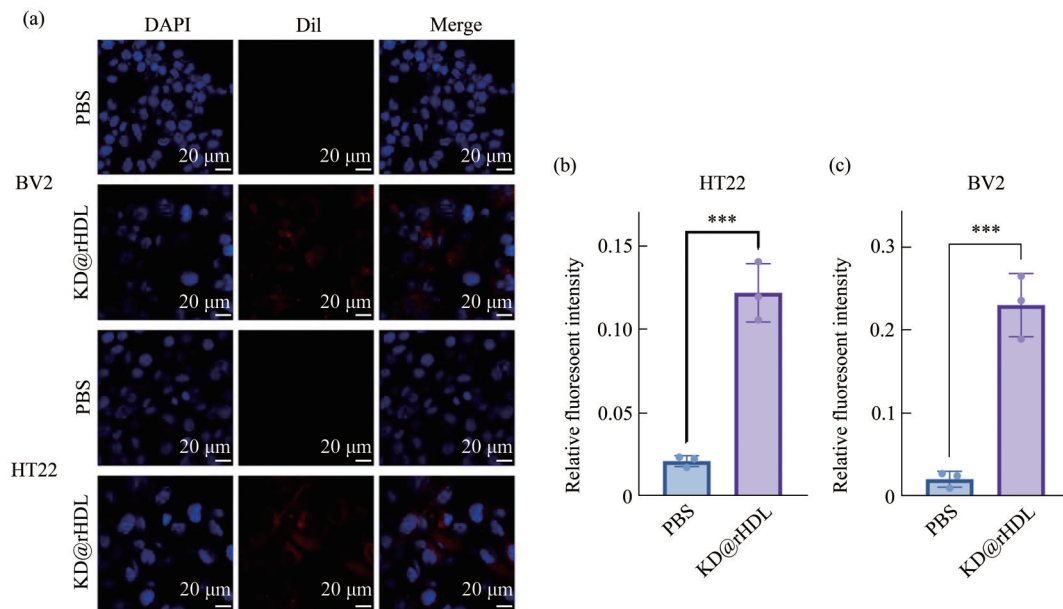


Fig. 5 Transwell experiment of BV2 and HT22 with KD@rHDL

Transwell experiment of BV2 and HT22 cells with KD@rHDL (a) and quantitative analysis (b, c). The data are depicted as mean±SD, and statistical significance was evaluated through *t* test. ****P*<0.001.

2.6 负载金线莲苷的高密度脂蛋白 (KD@rHDL) 改善小胶质细胞炎症状态

蛋白质印迹法验证了 KD@rHDL 可显著降低 NLRP3 蛋白的表达水平, 表明 KD@rHDL 能剂量依赖性地抑制 NLRP3 炎症小体的活化。高剂量的 KD@rHDL 可以显著降低成熟 IL-1β 的蛋白质表达水平 (图 6a)。

在 LPS 诱导的细胞炎症模型中, 与模型组相

比, 经不同浓度 KD@rHDL 预处理后, 高剂量给药细胞内 NLRP3 蛋白的表达水平出现显著下降。低剂量金线莲苷对 NLRP3 的抑制效果有限, 然而, 当使用高剂量 KD@rHDL 进行处理时, NLRP3 蛋白条带灰度值呈现出显著的降低, 其表达水平较模型组减少了约 20% (*P*<0.05) (图 6b)。这一结果在 3 次独立实验中得到了一致验证, 表明金线莲苷对 NLRP3 的转录或蛋白质稳定性具有明确的抑制

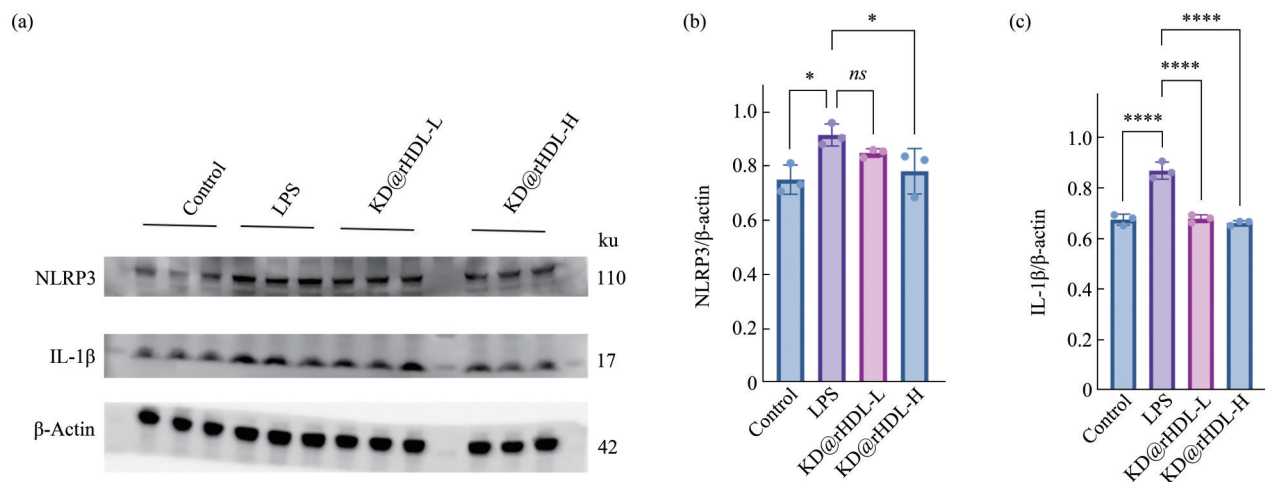


Fig. 6 The effect of KD@rHDL on the protein expression levels of pro-inflammatory factors

(a) Western blot of IL-1β and NLRP3 in LPS-induced primary microglia treated with KD@rHDL. LPS:1 mg/L; KD@rHDL-L: 1 mg/L LPS+10 mg/L KD@rHDL; KD@rHDL-H: 1 mg/L LPS+100 mg/L KD@rHDL. β-Actin was used as a reference standard. (b, c) Quantification of IL-1β and NLRP3. The data are shown as mean±SD, and statistical significance was evaluated using one-way ANOVA. **P*< 0.05, *****P*< 0.0001, ns: not significant.

作用。

更为重要的是, 本文对炎症小体下游效应分子 IL-1β 的蛋白质水平进行了检测。结果显示, 低、高剂量组细胞裂解液中检测到的成熟 IL-1β 蛋白量与模型组相比分别降低了约 10% 和 20% ($P < 0.0001$) (图 6c), 此结果与 NLRP3 蛋白的下调趋势相符, 从功能上证实了金线莲苷对 NLRP3 炎症小体整体信号通路的有效阻断, 即通过抑制上游传感器蛋白 NLRP3 的表达, 进而减少了 caspase-1 的激活, 最终导致其底物 pro-IL-1β 无法被切割转化为具有生物活性的成熟 IL-1β。

综上所述, 本研究在蛋白质水平上证实, KD@rHDL, 特别是高剂量给药, 能够显著抑制 NLRP3 炎症小体的核心组分 NLRP3 及其下游效应细胞因子 IL-1β 的生成。这为 KD@rHDL 作为一种潜在的 NLRP3 炎症小体抑制剂, 用于治疗相关神经炎症或代谢性疾病, 提供了关键的分子药理学依据。

3 讨 论

基于本研究的数据, KD@rHDL 在调控小胶质细胞功能方面展现出多重有益效应, 为 AD 等神经退行性疾病的治疗提供了新的潜在策略。

首先, Aβ 假说是 AD 的重要理论学说之一^[20], Aβ 也成为近年美国食品药品监督管理局 (Food and Drug Administration, FDA) 批准的多种抗体药物的唯一靶点^[21]与基础研究中重要治疗评价指标^[22]。研究表明, Aβ 清除主要依赖小胶质细胞的吞噬与消化^[23]。目前主流 Aβ 靶向治疗手段使用 Aβ 单克隆抗体促进小胶质细胞对 Aβ 的吞噬, 但单克隆抗体价格昂贵, 限制了其大规模应用。KD@rHDL 显著增强了小胶质细胞对 Aβ 的吞噬清除能力。这一过程可能涉及多种机制: 一方面, rHDL 本身作为天然的胆固醇逆转运载体, 可通过调节小胶质细胞的细胞膜流动性及脂筏结构, 促进吞噬相关受体的聚集与活化; 另一方面, 金线莲苷兼具抗炎和激活自噬的效用, 可增强小胶质细胞对 Aβ 的吞噬清除, 从而直接削减神经毒性斑块, 建立关键的神经保护机制^[24]。本研究中 KD@rHDL 对 Aβ 单体及寡聚体的亲和力常数分别为 141 nmol/L 和 169 nmol/L, 表明 KD@rHDL 对 Aβ 单体及寡聚体的结合不具有选择性。丁杨团队^[19]研究表明, 仿生 HDL 纳米颗粒具有类似抗原与抗体结合的高 Aβ 亲和力, 能够高效捕获 Aβ 并形成复合物, 随后

该复合物被小胶质细胞摄取并转运至溶酶体降解。Aβ 单体与寡聚体在脑内处于动态平衡之中。尽管寡聚体被认为是毒性最强的 Aβ 形式, 但单体作为寡聚体的前体, 其浓度的降低同样有助于减少寡聚体的生成。高小玲团队^[25]研究表明, rHDL 对 Aβ 单体与寡聚体均表现出高亲和力, 并在动物实验中表现出良好疗效。因此我们认为 KD@rHDL 具备动物水平的治疗潜力

目前, 以 Aducanumab、Lecanemab 为代表的抗 Aβ 单克隆抗体是 AD 疾病修饰治疗的前沿药物。临床试验证实, 这类药物可有效清除脑内 Aβ 斑块, 延缓认知功能下降。然而, 其年治疗费用高达数万美元, 治疗费用高昂严重限制了临床可及性, 尤其在低收入国家和地区难以推广应用。相比之下, 金线莲作为传统药用植物, 来源广泛、种植成本低, 金线莲苷提取工艺成熟, 具有显著的成本优势。rHDL 作为递送载体, 其主要成分磷脂和载脂蛋白均为内源性物质, 制备工艺成熟、成本可控, 具备规模化生产的可行性。KD@rHDL 作为一种生物相容性良好的纳米递送系统, 其生产成本显著低于抗体类药物。在机制方面, AD 中小胶质细胞的核心异常是免疫代谢稳态的崩溃。线粒体功能障碍导致能量代谢紊乱, 使小胶质细胞从神经保护者转变为病理推动者^[26]。因此, 改善其状态必须从根源恢复代谢功能, 才能将小胶质细胞重新编程为稳态, 使其有效清除 Aβ、减轻炎症, 并最终阻断 AD 的病理进展。单一靶向疗法往往难以阻断其恶性进展, 因此, 本研究提出的 KD@rHDL 联合治疗策略旨在实现多维度协同治疗。研究表明, 金线莲苷核心作用于胞内代谢枢纽, 从根源上修复小胶质细胞的线粒体功能, 将其从病理推动者重新编程为稳态保护者^[27], 其本身对 Aβ 单体与寡聚体的高亲和力还能直接促进病理蛋白的清除^[27]。

其次, 本研究证实 KD@rHDL 能有效改善小胶质细胞的炎症状态。在 LPS 刺激下, 小胶质细胞通常会过度活化并极化为促炎的 M1 表型, 大量释放 IL-1β、TNF-α 等炎症因子。本研究数据显示, KD@rHDL 高剂量处理能显著下调 NLRP3 炎症小体关键组分的表达, 并抑制成熟 IL-1β 的产生。而 KD@rHDL 低剂量处理组 NLRP3 表达抑制不显著, 但对下游炎症因子 IL-1β 的抑制却达到显著水平, 可能是因为 NLRP3 炎症小体的活化受到多层次调控机制的影响。NLRP3 的活化不仅依赖于其蛋白质表达水平, 还受到磷酸化、泛素化、S-亚硝基化

等翻译后修饰的精密调控。KD@rHDL可能通过抑制NLRP3的活化状态而非下调其表达水平,来减少IL-1 β 的产生。还可能因为IL-1 β 的产生受多重信号通路调控^[7]。除NLRP3炎症小体依赖性Caspase-1活化外,IL-1 β 的转录和成熟还受到TLR4/MyD88/NF- κ B通路、p38 MAPK通路以及非经典炎症小体通路的协同调控^[28]。综上所述,低剂量KD@rHDL可能通过抑制上述上游信号通路,在NLRP3表达变化不显著的情况下,实现对IL-1 β 的有效抑制。低剂量KD@rHDL对NLRP3表达与IL-1 β 分泌的差异化调控作用,反映了其在炎症调控中的多靶点特性。后续研究将进一步通过检测NLRP3的翻译后修饰状态、凋亡相关斑点样蛋白质(apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD, ASC)寡聚化水平及相关上游信号通路的活化情况,深入阐明这一现象的分子机制。

另外,CCK-8实验结果显示,在400 mg/L浓度以下KD@rHDL对BV2小胶质细胞未表现出明显的细胞毒性,初步表明该材料在此浓度范围内具有良好的生物相容性。需要说明的是,本研究中后续功能实验所采用的KD@rHDL浓度均小于400 mg/L,且在该浓度范围内细胞活力未受到显著影响。因此,当前设置的400 mg/L作为最高浓度的细胞毒性实验,其检测范围已覆盖所有功能实验的工作浓度,足以支撑本研究关于KD@rHDL安全性和生物相容性的相关结论。当然,本研究仅评估了400 mg/L范围内的细胞毒性存在一定的局限性,更高浓度下的安全性需进一步验证,为其潜在应用提供更充分的安全性依据。

KD@rHDL相较于抗A β 单抗在成本方面具有显著优势,但本研究仍存在以下局限性亟待改进。第一,本研究仅采用LPS诱导的BV-2细胞炎症模型,后续研究需要在APP/PS1转基因AD小鼠模型中进行在体验证,以明确KD@rHDL在复杂体内环境中的实际疗效及认知功能改善效果。第二,本研究采用Transwell实验,验证KD@rHDL跨屏障转运能力。后续研究可结合活体成像等技术,定量分析KD@rHDL在脑内的分布、蓄积及代谢动力学特征,以直接验证其血脑屏障穿透能力与脑靶向效率。第三,本研究主要聚焦于NF- κ B信号通路及小胶质细胞极化表型,后续研究需结合转录组学与蛋白质组学技术,系统筛选KD@rHDL调控的关键信号通路及靶点,以全面阐明其多靶点协同作

用机制。

综上所述,KD@rHDL巧妙地融合了rHDL的递送与生物调节优势以及金线莲苷的抗炎与神经保护活性,形成了一种“多功能一体化”的纳米治疗平台。它不仅能促进小胶质细胞发挥其关键的A β 清除功能,还能抑制其有害的过度炎症反应,且在整个过程中保持了良好的生物相容性。这种调控策略,为精准干预神经炎症、重塑脑内免疫微环境提供了极具前景的新方向。

4 结 论

本研究成功构建了负载金线莲苷的重组高密度脂蛋白纳米递送系统KD@rHDL,其粒径均一,呈典型盘状结构,具有良好的载药性能和胶体稳定性。SPR实验证实KD@rHDL与A β 单体及寡聚体均具有高亲和力,细胞吞噬实验显示KD@rHDL可显著促进小胶质细胞对A β 的摄取。安全性评价表明,KD@rHDL在实验浓度范围内对小胶质细胞和海马神经元细胞均无明显细胞毒性,具有良好的生物相容性。Transwell实验结果显示KD@rHDL能够有效穿过血脑屏障模型并被脑实质细胞摄取。蛋白质印迹法进一步证实,高剂量的KD@rHDL可显著降低LPS诱导的小胶质细胞中NLRP3蛋白及成熟IL-1 β 的表达水平,有效抑制NLRP3炎症小体的活化。综上,KD@rHDL兼具促进A β 吞噬和抑制NLRP3/IL-1 β 炎症通路的双重功能,且具有良好的生物安全性和跨屏障能力,为AD的治疗提供了新的候选策略。

参 考 文 献

- [1] Scheltens P, De Strooper B, Kivipelto M, *et al.* Alzheimer's disease. *Lancet*, 2021, **397**(10284): 1577-1590
- [2] Ferri C P, Prince M, Brayne C, *et al.* Global prevalence of dementia: a Delphi consensus study. *Lancet*, 2005, **366**(9503): 2112-2117
- [3] Prince M, Bryce R, Albanese E, *et al.* The global prevalence of dementia: a systematic review and metaanalysis. *Alzheimers Dement*, 2013, **9**(1): 63-75.e2
- [4] 赵世英,张慧.阿尔茨海默病的发病机制研究进展. *河北医药*, 2025, **47**(7): 1187-1191
Zhao S Y, Zhang H. *Hebei Med J*, 2025, **47**(7): 1187-1191
- [5] Graff-Radford J, Yong K X X, Apostolova L G, *et al.* New insights into atypical Alzheimer's disease in the era of biomarkers. *Lancet Neurol*, 2021, **20**(3): 222-234
- [6] Sarlus H, Heneka M T. Microglia in Alzheimer's disease. *J Clin Invest*, 2017, **127**(9): 3240-3249

- [7] McKinney J E, Bennett M L, Bennett F C. Basic microglial functions and how they go awry in neurodegenerative disease. *Annu Rev Pathol*, 2026, **21**(1): 59-80
- [8] Agrawal M, Saraf S, Saraf S, *et al*. Nose-to-brain drug delivery: an update on clinical challenges and progress towards approval of anti-Alzheimer drugs. *J Control Release*, 2018, **281**: 139-177
- [9] Yamauchi Y, Sharpe L J, Brown A J. Balancing cholesterol metabolism in the liver and gut: perspectives in health and disease. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 2026, **23**(5): 395-410
- [10] Chernick D, Zhong R, Li L. The role of HDL and HDL mimetic peptides as potential therapeutics for Alzheimer's disease. *Biomolecules*, 2020, **10**(9): 1276
- [11] Jin Y, Du Q, Song M, *et al*. Amyloid-β-targeting immunotherapies for Alzheimer's disease. *J Control Release*, 2024, **375**: 346-365
- [12] Han G, Jin Y, Bai K, *et al*. Biomimetic elasticity compressed assembly controls rapid intracerebral drug release to reverse microglial dysfunction. *Sci Adv*, 2025, **11**(18): eadr0656
- [13] Zou X, Zhang K, Li X, *et al*. Current advances on the phytochemistry, pharmacology, quality control and applications of *Anoectochilus roxburghii*. *Front Pharmacol*, 2024, **15**: 1527341
- [14] Yuan X, Ni H, Shi F, *et al*. The anti-aging and anti-Alzheimer's disease potential of kinsenoside prepared from *Anoectochilus roxburghii*. *Fitoterapia*, 2025, **182**: 106441
- [15] Chen Y, Deng Q, Wang C, *et al*. Investigation of cognitive enhancements and mechanisms of kinsenoside in APP/PS1 mice through network pharmacology, *in vivo* experiments, and machine learning. *Life Sci*, 2025, **378**: 123810
- [16] Jin Y, Chifodya K, Han G, *et al*. High-density lipoprotein in Alzheimer's disease: from potential biomarkers to therapeutics. *J Control Release*, 2021, **338**: 56-70
- [17] De Strooper B, Karran E. The cellular phase of Alzheimer's disease. *Cell*, 2016, **164**(4): 603-615
- [18] Leng F, Edison P. Neuroinflammation and microglial activation in Alzheimer disease: where do we go from here?. *Nat Rev Neurol*, 2021, **17**(3): 157-172
- [19] Zhang H, Jiang W, Zhao Y, *et al*. Lipoprotein-inspired nanoscavenger for the three-pronged modulation of microglia-derived neuroinflammation in Alzheimer's disease therapy. *Nano Lett*, 2022, **22**(6): 2450-2460
- [20] Yip K C, Ho W F, Liu Y, *et al*. APP-C31 pathology as a target in neurodegenerative diseases. *J Biomed Sci*, 2026, **33**(1): 15
- [21] Sims J R, Zimmer J A, Evans C D, *et al*. Donanemab in early symptomatic Alzheimer disease: the TRAILBLAZER-ALZ 2 randomized clinical trial. *JAMA*, 2023, **330**(6): 512-527
- [22] 杜源中, 王哲, 马定财, 等. 黄芪、石菖蒲活性成分及其药对抗阿尔茨海默病的作用机制研究进展. *中国中药杂志*, 2026. <https://doi.org/10.19540/j.cnki.cjcm.20260209.501>
- [23] Gao C, Jiang J, Tan Y, *et al*. Microglia in neurodegenerative diseases: mechanism and potential therapeutic targets. *Sig Transduct Target Ther*, 2023, **8**: 359
- [24] Wang Z, Feng W, Li X, *et al*. Targeting the Nrf2/HO-1 axis: a therapeutic strategy against regulated cell death in Alzheimer's disease. *Ageing Res Rev*, 2026, **116**: 103035
- [25] Song Q, Huang M, Yao L, *et al*. Lipoprotein-based nanoparticles rescue the memory loss of mice with Alzheimer's disease by accelerating the clearance of amyloid-beta. *ACS Nano*, 2014, **8**(3): 2345-2359
- [26] Li Q, Liao Y, Zhao Y B, *et al*. Kinsenoside targets IDH1 to restore microglial immune-metabolic homeostasis for Alzheimer's disease therapy. *Adv Sci (Weinh)*, 2026: e75125
- [27] Gao C, Liu Y, Zhang T L, *et al*. Biomembrane-derived nanoparticles in Alzheimer's disease therapy: a comprehensive review of synthetic lipid nanoparticles and natural cell-derived vesicles. *Int J Nanomedicine*, 2023, **18**: 7441-7468
- [28] 蒋倩, 赵恺, 尧小龙, 等. Toll样受体4信号通路在脑损伤后小胶质细胞与星形胶质细胞的炎性反应作用机制. *中华实验外科杂志*, 2018, **35**(11): 2099-2102
- Jiang Q, Zhao K, Yao X L, *et al*. *Chin J Exp Surg*, 2018, **35**(11): 2099-2102

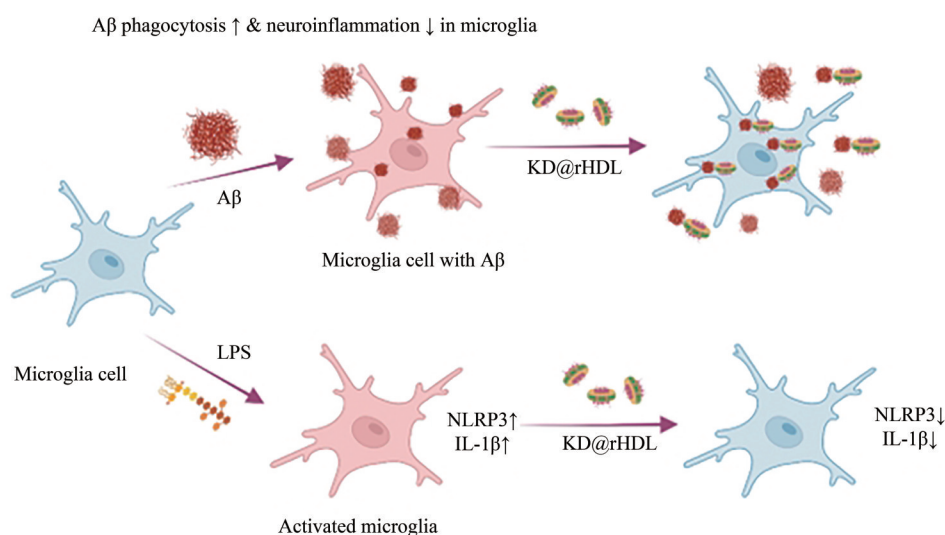
Kinsenoside-loaded Recombinant High-density Lipoprotein Enhances Beta-amyloid Phagocytosis Capacity and Reduces Inflammatory Levels of Microglia*

CHEN Lu-Yao¹⁾, MU Yan²⁾, HUA Qian^{1)**}

¹⁾College of Life Sciences, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 102400, China;

²⁾College of Traditional Chinese Medicine, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 102400, China)

Graphical abstract



Abstract Objective This study aims to construct a reconstituted high-density lipoprotein (rHDL) delivery system loaded with kinsenoside (KD@rHDL), and to systematically evaluate its function in enhancing the phagocytosis of amyloid β -protein (A β) by microglia and improving the inflammatory state of microglia, as well as to preliminarily explore its potential application value in the treatment of Alzheimer's disease (AD). **Methods** KD@rHDL was prepared by the film hydration method combined with probe sonication and co-incubation. Its morphology was observed by transmission electron microscopy, and the particle size and Zeta potential were measured by dynamic light scattering. The encapsulation efficiency and drug loading were determined by high-performance liquid chromatography. The affinity between KD@rHDL and A β was analyzed by surface plasmon resonance (SPR) to assess its feasibility as a medium for A β clearance. At the cellular level, after treating mouse microglial cells (BV-2 cells) with KD@rHDL and adding fluorescently labeled A β , the phagocytic efficiency of microglia for A β was detected by confocal microscopy. Meanwhile, the CCK-8 method was used to evaluate the effect of KD@rHDL on cell viability to determine its safety. The trans-barrier transport ability of KD@rHDL was detected by Transwell assay. The expression levels of NLRP3 inflammasome and

* This work was supported by grants from The National Natural Science Foundation of China (U21A20414, U25A20613).

** Corresponding author.

Tel: 86-10-64286498, E-mail: hqianz@aliyun.com

Received: February 26, 2026 Accepted: May 20, 2026

downstream inflammatory factor IL-1 β in LPS-induced microglia were detected by Western blot to evaluate the regulatory effect of KD@rHDL on the inflammatory state of cells. **Results** Characterization results showed that the successfully prepared KD@rHDL presented a typical discoid structure under transmission electron microscopy, with a uniform particle size distribution, an average particle size of approximately (14.4 $\pm$ 0.24) nm, and a suitable negative Zeta potential, demonstrating good colloidal stability. The drug content determination results indicated that the encapsulation efficiency of KD@rHDL for kinsenoside was (42.24 $\pm$ 1.30)%, and the drug loading was (6.03 $\pm$ 0.19)%, indicating a good drug loading capacity. The CCK-8 assay results showed that in the set concentration range, the survival rates of BV2 and HT22 cells in the KD@rHDL treatment group were all above 90%, with no significant difference from the control group, indicating good cell safety of the formulation. The results of the A β phagocytosis experiment indicated that, compared with the A β oligomers (A β o) group alone, the fluorescence signal intensity within microglia in the KD@rHDL treatment group was significantly enhanced, and a large amount of fluorescence-labeled A β was observed to accumulate intracellularly under a fluorescence microscope. The SPR assay results showed that rHDL had a strong affinity for A β , with an affinity constant reaching the nanomolar level. Transwell assay results indicated that KD@rHDL could effectively cross the bEnd.3 cell monolayer barrier and be taken up by BV2 and HT22 cells. Western blot assay results showed that high-dose KD@rHDL treatment could significantly reduce the expression level of NLRP3 protein in LPS-induced microglia and simultaneously down-regulate the maturation and secretion of IL-1 β , indicating that KD@rHDL can effectively inhibit the activation of the NLRP3 inflammasome pathway and improve the neuroinflammatory state mediated by microglia. **Conclusion** This study successfully constructed a reconstituted high-density lipoprotein delivery system loaded with kinsenoside (KD@rHDL). This nano-delivery system not only significantly enhances the phagocytic clearance ability of microglia towards A β , but also effectively inhibits the NLRP3/IL-1 β -mediated inflammatory pathway, improving the inflammatory state of microglia. The above results indicate that KD@rHDL has a synergistic effect in promoting A β clearance and alleviating neuroinflammation, demonstrating potential therapeutic value for AD and providing new ideas and experimental basis for the development of subsequent AD treatment strategies.

Key words Alzheimer's disease, recombinant high-density lipoprotein, kinsenoside, amyloid β -protein, IL-1 β , NLRP3

DOI: 10.3724/j.pibb.2026.0095

CSTR: 32369.14.pibb.20260095