C-藻蓝蛋白纳米微球的制备及体外抗脂多糖联合海水诱导急性肺损伤的作用机制研究Δ

解佑银*，汪镕金，邵丽林，刘关童，张雷芳#（浙江海洋大学食品与药学学院，浙江 舟山 316022）

中图分类号 R965；R944　　**文献标志码** A　　**文章编号** 1001-0408（2024）16-1964-08
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2024.16.05

摘　要　目的 制备C-藻蓝蛋白纳米微球（CPC-NPs）并评价其对脂多糖（LPS）联合海水诱导急性肺损伤的体外作用机制。**方法** 采用离子交联法，以CPC为药物、羧甲基壳聚糖（CMCS）为载体、$CaCl_2$为交联剂制备CPC-NPs，对CPC-NPs进行基础表征。小鼠肺泡Ⅱ型上皮细胞MLE-12和巨噬细胞RAW264.7均分为7组：正常组（Con组），模型组（Mod组），空白NPs组，CPC-NPs 30、60、120、240 μg/mL组。除Con组外其余各组均采用10 μg/mL LPS和25%海水联合处理6 h，造模后各给药组加相应剂量药物处理24 h。检测MLE-12细胞中丙二醛（MDA）、总抗氧化能力（T-AOC）、超氧化物歧化酶（SOD）、过氧化氢酶（CAT）、谷胱甘肽过氧化物酶（GSH-Px）水平，B细胞淋巴瘤2（Bcl-2）、Bcl-2关联X蛋白（Bax）、胱天蛋白酶-3（caspase-3）蛋白和mRNA，以及CAT、谷胱甘肽S-转移酶（GST）mRNA表达水平；检测RAW264.7细胞中白细胞介素1β（IL-1β）、肿瘤坏死因子α（TNF-α）、IL-6水平，NOD样受体热蛋白结构域相关蛋白3（NLRP3）、剪切的caspase 1（cleaved-caspase-1）蛋白及IL-1β、TNF-α、IL-6、诱导型一氧化氮合酶（iNOS）mRNA表达水平。**结果** 制备的CPC-NPs粒径为（675.69±64.58）nm，Zeta电位为（−20.11±0.98）mV，多分散系数为0.455±0.010（n=3）；包封率为35.60%，载药量为16.13%；形态为规则的球形；其中药物可持续释放30 h以上。与Mod组比较，CPC-NPs各浓度组MLE-12细胞中T-AOC、SOD、CAT（除CPC-NPs 30 μg/mL组外）、GSH-Px水平和CAT、GST mRNA表达水平以及Bcl-2/Bax蛋白比值和mRNA比值均显著升高，MDA水平和caspase-3蛋白及mRNA表达水平均显著降低（P<0.01或P<0.05）。与Mod组比较，CPC-NPs各浓度组RAW264.7细胞中IL-1β、TNF-α、IL-6水平和NLRP3、cleaved-caspase-1蛋白表达水平以及IL-1β、TNF-α、IL-6、iNOS mRNA表达水平均显著降低（P<0.01或P<0.05）。**结论** 成功制备了具有肺靶向性和缓释性的CPC-NPs。CPC-NPs可以通过抗氧化应激及抑制细胞凋亡和炎症反应来缓解LPS联合海水诱导的急性肺损伤。

关键词 C-藻蓝蛋白；纳米微球；急性肺损伤；氧化应激；凋亡；炎症反应；海水；脂多糖

Preparation of C-phycocyanin nanospheres and the *in vitro* effect mechanism on acute lung injury induced by lipopolysaccharide combined with seawater

XIE Youyin, WANG Rongjin, SHAO Lilin, LIU Guantong, ZHANG Leifang (School of Food and Pharmacy, Zhejiang Ocean University, Zhejiang Zhoushan 316022, China)

ABSTRACT　OBJECTIVE To prepare C-phycocyanin nanoparticles (CPC-NPs) and evaluate the *in vitro* mechanism of CPC-NPs on acute lung injury induced by lipopolysaccharide (LPS) combined with seawater. **METHODS** Ion crosslinking method was used to prepare CPC-NPs using CPC as the drug, carboxymethyl chitosan (CMCS) as the carrier, and $CaCl_2$ as the crosslinking agent. The basic characterization of CPC-NPs was carried out. Mouse alveolar type Ⅱ epithelial cells MLE-12 and macrophages RAW264.7 were divided into 7 groups: normal group (Con group), model group (Mod group), blank NPs group, CPC-NPs 30, 60, 120 and 240 μg/mL groups. Except for the Con group, all other groups were treated with a combination of 10 μg/mL LPS and 25% seawater for 6 hours. After modeling, each treatment group was treated with corresponding drugs for 24 hours. The levels of malondialdehyde (MDA), total antioxidant capacity (T-AOC), superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), and glutathione peroxidase (GSH-Px) in MLE-12 cells, as well as the expression levels of B-cell lymphoma-2 (Bcl-2), Bcl-2 associated X protein (Bax), caspase-3 protein and mRNA, CAT and glutathione S-transferase (GST) mRNA were determined. The levels of interleukin-1β (IL-1β), tumor necrosis factor-α (TNF-α) and IL-6 in RAW264.7 cells, as well as the expression levels of NOD-like receptor thermal protein domain associated protein 3 (NLRP3), cleaved caspase-1 protein, and mRNA expressions of IL-1β, TNF-α, IL-6 and inducible nitric oxide synthase (iNOS) were all detected. **RESULTS** The prepared CPC-NPs had particle size of (675.69±64.58) nm, Zeta potential of (−20.11±0.98) mV, polydispersity coefficient of 0.455±0.010 (n=3);

Δ **基金项目** 国家自然科学基金项目（No.81903693）；浙江省高校基本科研业务费专项（No.2019J00013）

* **第一作者** 硕士研究生。研究方向：海洋药物与生物制品。E-mail：18658015918@163.com

通信作者 讲师，博士。研究方向：海洋药物与生物制品。E-mail：zhangleifang1986@163.com

entrapment efficiency of 35.60%, and drug loading of 16.13%; CPC-NPs had regular spherical shapes, where the drug could be sustainably released for more than 30 hours. Compared with Mod group, the levels of T-AOC, SOD, CAT (excluding the 30 μg/mL group of CPC-NPs) and GSH-Px, mRNA expressions of CAT and GST, as well as the Bcl-2/Bax protein ratio and mRNA ratio were significantly increased in MLE-12 cells of different concentration groups of CPC-NPs, while MDA levels and caspase-3 protein and mRNA expression were significantly reduced ($P<0.01$ or $P<0.05$). Compared with Mod group, the levels of IL-1β, TNF-α and IL-6, NLRP3 and cleaved-caspase-1 protein expressions, as well as the mRNA expressions of IL-1β, TNF-α, IL-6 and iNOS in RAW264.7 cells of different concentration groups of CPC-NPs were significantly reduced ($P<0.01$ or $P<0.05$). **CONCLUSIONS** CPC-NPs with lung targeting and sustained release property were prepared successfully, which can alleviate acute lung injury induced by LPS combined with seawater through antioxidant stress, inhibiting cell apoptosis and inflammatory response.
KEYWORDS C-phycocyanin; nanospheres; acute lung injury; oxidative stress; apoptosis; inflammatory response; seawater; lipopolysaccharide

急性肺损伤是溺水最常见的并发症之一[1]。溺水后，肺泡中的水会破坏肺表面活性物质并诱发氧化应激，且海水因高渗透压且成分复杂，通常会造成比淡水更为严重的肺损伤[2]。

海水淹溺的病理过程包括缺氧、低温高渗和微生物感染，其中微生物感染引起的肺炎是重症监护室收治的溺水幸存者最常见的并发症[3]。有研究发现，在海水中野生型肠杆菌（*Enterobacter* spp.）是最具代表性的细菌种类[3]。肠杆菌是革兰氏阴性菌，而脂多糖（lipopolysaccharide，LPS）是革兰氏阴性菌细胞壁的组成部分，其被认为是导致急性肺损伤最重要的病原体；在临床情况下，LPS常引起急性呼吸窘迫综合征，引发快速而强劲的炎症反应，损害巨噬细胞等免疫细胞的正常功能[4]。随着海洋产业的发展，寻求药物改善溺水患者的肺损伤有重要意义。笔者团队前期研究发现，C-藻蓝蛋白（C-phycocyanin，CPC）能很好地改善LPS联合海水诱导的急性肺损伤[5]。

CPC是一种来源于螺旋藻的蓝色蛋白复合色素，目前主要应用于食品、天然活性药物和医疗诊断荧光探针等领域[6]。研究发现，CPC具有抗氧化[7]、抗炎[8]、抗肿瘤[9]、保护肝脏[10]等多种生理活性。然而，由于CPC易被体内蛋白酶分解，所以限制了其在治疗中的效果。为增强CPC的稳定性与靶向效应，可以采用羧甲基壳聚糖（carboxymethyl chitosan，CMCS）作为载体。CMCS具有良好的水溶性和生物相容性，无毒并可以提高药物疗效[11]。此外，纳米技术可将药物包裹在纳米级载体上，延长半衰期和优化代谢途径，从而提高药效并减少副作用[11-12]。纳米技术的进步促成了CMCS-纳米微球（nanoparticle，NPs）的构建，通过调整粒径和电位，可以实现药物在特定区域的集中释放[13]，这对急性肺损伤的治疗具有潜在价值。本研究旨在开发CPC-NPs，同时，利用体外实验探究其对LPS联合海水诱导急性肺损伤的作用机制，旨在为后续体内生物学评价和药效学研究打下基础，并为临床治疗提供新的思路和方法。

1 材料

1.1 主要仪器

ISPLab06型注射泵购自度科工业科技（上海）有限公司；ALPHA 1-4 LD plus型冷冻干燥机购自德国Marin Christ公司；Spectrum 100型红外光谱仪购自美国Perkin-Elmer公司；JEM-F200型透射电镜购自捷欧路（北京）科贸有限公司；BeNano 90 Zeta型纳米粒度电位分析仪购自丹东百特仪器有限公司；Mini-Protein型电泳系统、CFX96型实时荧光定量聚合酶链反应（qPCR）仪均购自美国Bio-Rad公司；SpectraMax M2型多功能酶标仪购自美国Molecular Devices公司；FluorChem FC3型化学发光成像系统购自美国ProteinSimple公司；UV-1600型紫外-可见分光光度计购自上海美谱达仪器有限公司。

1.2 主要药品与试剂

CPC（批号KLM211019，纯度98%）购自上海谱振生物科技有限公司；CMCS、$CaCl_2$、NaCl、$MgCl_2$、$MgSO_4$、NaBr、$NaHCO_3$、KCl（批号分别为20200914、20150806、20221016、20111220、20170712、20190710、20180608、20100915，均为分析纯）均购自国药集团化学试剂有限公司；DMEM/F-12培养基、DMEM高糖培养基、胎牛血清（批号分别为2247167、2285119、2267991）均购自美国Thermo Fisher Scientific公司；CCK-8试剂盒（批号GK10001）购自艾普拜生物科技（苏州）有限公司；LPS和总抗氧化能力（total antioxidant capacity，T-AOC）、超氧化物歧化酶（superoxide dismutase，SOD）、过氧化氢酶（catalase，CAT）、丙二醛（malondialdehyde，MDA）、谷胱甘肽过氧化物酶（glutathione peroxidase，GSH-Px）试剂盒以及Bradford蛋白浓度测定试剂盒（批号分别为

062722221214、062922221122、110122221128、0716222-21201、081722221214、011822221226、063822221228）均购自上海碧云天生物技术股份有限公司；白细胞介素1β（interleukin-1β，IL-1β）、肿瘤坏死因子α（tumor necrosis factor-α，TNF-α）、IL-6酶联免疫吸附试验（ELISA）试剂盒（批号分别为M210709-046a、M200629-102a、M221216-004a）均购自上海欣博盛生物科技有限公司；兔α-微管蛋白（α-tubulin）单克隆抗体（批号GR3281114-3）购自艾博抗（上海）贸易有限公司；兔B细胞淋巴瘤2（B-cell lymphoma-2，Bcl-2）多克隆抗体、兔Bcl-2关联X蛋白（Bcl-2 associated X protein，Bax）多克隆抗体、兔胱天蛋白酶3（caspase-3）多克隆抗体（批号分别为00118470、00114379、00120689）均购自武汉三鹰生物技术有限公司；兔剪切的caspase1（cleaved-caspase-1）多克隆抗体、兔NOD样受体热蛋白结构域相关蛋白3（NOD-like receptor thermal protein domain associated protein 3，NLRP3）多克隆抗体（批号分别为14e3164、87p8121）均购自亚飞（上海）生物医药科技有限公司。

1.3 实验细胞

小鼠肺泡Ⅱ型上皮细胞MLE-12由浙江工业大学惠赠，小鼠单核巨噬细胞RAW264.7购自上海中乔新舟生物科技有限公司。

2 方法

2.1 CPC-NPs的制备

参考相关文献[14－15]并改良，采用离子交联法制备CPC-NPs，具体方法如下：在避光条件下，称量100 mg CMCS粉末，以超纯水配制成质量浓度为4 mg/mL的CMCS溶液，800 r/min磁力搅拌10 min；称量100 mg CPC，以超纯水配制成质量浓度为80 mg/mL的CPC溶液；向CMCS溶液中逐滴滴加CPC溶液，按质量比6∶5（m_{CMCS}∶m_{CPC}）混合，800 r/min磁力搅拌15 min；称量150 mg $CaCl_2$，以超纯水配制成质量浓度为3 mg/mL的$CaCl_2$溶液；向CPC和CMCS混合溶液中逐滴滴加2 mL $CaCl_2$溶液，4 ℃避光搅拌1 h后，转移至多个15 mL带盖离心管中，以12 000 r/min离心10 min，沉淀用超纯水洗涤并重悬，得冷冻干燥产物即CPC-NPs。制备空白NPs的时候不添加CPC，其余操作同CPC-NPs的制备过程。

2.2 CPC-NPs的表征

2.2.1 粒径、Zeta电位、多分散系数的测定

将CPC-NPs溶于磷酸盐缓冲液中，配制成质量浓度为3 mg/mL的溶液，用纳米粒度电位分析仪测定CPC-NPs的粒径、Zeta电位、多分散系数（polydispersity index，PDI）。

2.2.2 包封率和载药量的计算

用紫外-可见分光光度计测量CPC-NPs溶液在652、620 nm波长处的吸光度（absorbance，A）。利用公式计算载药量（drug loading，DL）、包封率（entrapment efficiency，EE）。CPC的质量（m_{CPC}）＝（A_{620}－0.474A_{652}）/5.34；DL（%）＝m_{CPC}/$m_{CPC\text{-}NPs}$×100%；EE（%）＝m_{CPC}/$m_{CPC原料}$×100%。其中，m_{CPC}表示CPC-NPs中CPC的质量，$m_{CPC\text{-}NPs}$表示CPC-NPs的质量，$m_{CPC原料}$表示CPC原料投入质量。

2.2.3 紫外吸收光谱扫描

分别对CPC、空白NPs、CPC-NPs进行紫外吸收光谱扫描，波长400～800 nm。

2.2.4 红外光谱扫描

取适量溴化钾粉末，75 ℃干燥5 h，与适量的待测CPC-NPs充分混合并研磨成粉，压制成片，置于红外光谱仪中扫描，分析其特征官能团。采用同样的方法制成CPC、空白NPs的溴化钾压片，并进行红外光谱扫描。

2.2.5 NPs形态观察

将空白NPs、CPC-NPs溶液超声处理15 min，均匀分散后，将液滴滴于铜网，静置沉降10 min，使用滤纸吸去多余的液体以确保样品充分干燥。委托文治（上海）测试技术中心使用透射电镜采集图像并观察空白NPs、CPC-NPs的形态。

2.2.6 体外释放实验

采用透析扩散法，在pH为7.4的磷酸盐缓冲液中检测CPC的体外释放量。将含2 mg的CPC-NPs重悬液放置于透析袋中，将透析袋放置于含有足量磷酸盐缓冲液的试剂瓶中，将整个试剂瓶水平置于恒温振荡器上，以37 ℃恒温、300 r/min恒定频率释放。分别在0、2、4、6、12、18、24、30、36、42、48 h时取出袋中的100 μL液体（同时用等温的磷酸盐缓冲液补回），参照“2.2.2”项下方法计算释放的m_{CPC}，按以下公式计算累计释放率，并绘制释放曲线。累计释放率（%）＝（m_{CPC}/$m_{CPC\text{-}NPs}$）×100%。

2.3 细胞实验

2.3.1 细胞培养、分组、造模与给药

MLE-12细胞采用含10%胎牛血清的DMEM/F-12培养基培养，RAW264.7细胞采用含10%胎牛血清的DMEM高糖培养基培养，两种细胞均在37 ℃、5%CO_2条件下培养。

配制LPS联合25%海水的溶液，其中LPS质量浓度为0.5 mg/mL[5]。实验中所用海水参考中国国家海洋局第三研究所提供的配方配制，主要成分及含量接近我国东南沿海海水，pH为8.2，比重为1.05，渗透压为1 300 mmol/L。海水的具体成分如下：NaCl 26.518 g/L，$MgCl_2$

2.447 g/L，$MgSO_4$ 3.305 g/L，$CaCl_2$ 1.141 g/L，NaBr 0.083 g/L，$NaHCO_3$ 0.202 g/L，KCl 0.725 g/L。配制好的海水高压灭菌后于4 ℃冰箱保存。

MLE-12、RAW264.7细胞均分为7组，每个实验组3个复孔：正常组（Con组），模型组（Mod组，10 μg/mL LPS联合25%海水处理6 h），空白NPs组（10 μg/mL LPS联合25%海水处理6 h后，给予240 μg/mL空白NPs处理24 h），CPC-NPs 30、60、120、240 μg/mL组（10 μg/mL LPS联合25%海水处理6 h后，分别给予30、60、120、240 μg/mL CPC-NPs处理24 h）。给药剂量参考文献[16]。造模6 h后，显微镜观察发现悬浮细胞增多、贴壁细胞减少表明造模成功[17]。

2.3.2　MLE-12细胞中氧化应激指标检测

将MLE-12细胞以1×10^6 mL^{-1}的密度接种于6孔板中，按照“2.3.1”项下方法进行分组和给药，收集细胞样本并按照相应试剂盒说明书检测细胞中MDA、T-AOC、SOD、CAT、GSH-Px水平。

2.3.3　MLE-12细胞中凋亡相关蛋白表达检测

采用Western blot法检测。将MLE-12细胞以1×10^6 mL^{-1}的密度接种于6孔板中，按照“2.3.1”项下方法进行分组和给药。收集细胞，用磷酸盐缓冲液洗涤3次，RIPA裂解液裂解细胞，用细胞刮将细胞全部刮下，转移至离心管中，冰上裂解30 min后，在4 ℃条件下以12 000 r/min离心，随后收集上清液。利用Bradford蛋白浓度测定试剂盒测定裂解后MLE-12细胞的蛋白浓度，将样本浓度调整一致，置于100 ℃沸水浴5 min，离心后取上清液。取变性蛋白适量，进行聚丙烯酰胺凝胶电泳（电压200 V），分离蛋白并转膜（电流400 mA），使用快速封闭液进行封闭；洗膜后，加入Bcl-2、Bax、caspase-3蛋白一抗（稀释比例均为1∶1 000），4 ℃过夜孵育；洗膜后，加入二抗（稀释比例为1∶1 000），室温振荡孵育2 h；洗膜后，滴加超敏ELC化学发光试剂进行显影并成像。使用Image-Pro Plus 6.0软件分析蛋白条带灰度值，以目的蛋白与内参蛋白（α-tubulin）灰度值比值表示目的蛋白的表达水平，并计算Bcl-2/Bax蛋白比值，用于观察细胞凋亡的变化情况。

2.3.4　MLE-12细胞中CAT、谷胱甘肽S-转移酶、Bcl-2、Bax、caspase-3 mRNA表达检测

采用qPCR检测。将MLE-12细胞以1×10^6 mL^{-1}密度接种至6孔板中，按照“2.3.1”项下方法进行分组和给药。收集细胞，采用Trizol法提取纯化细胞总RNA，反转录为cDNA，并按照试剂盒说明书进行操作。反应体系：模板DNA 1 μL，上、下游引物各0.4 μL，2×qPCR SuperMix 10 μL，加水（不含核酸酶）至20 μL。以18S RNA作为内参，以$2^{-\Delta\Delta Ct}$法计算CAT、谷胱甘肽S-转移酶（glutathione S-transferase，GST）、Bcl-2、Bax、caspase-3 mRNA的表达水平，并计算Bcl-2/Bax mRNA比值，用于观察细胞凋亡的变化情况。引物由苏州泓迅生物科技股份有限公司设计、合成。引物序列及产物长度见表1。

表1　PCR引物序列及产物长度

基因	序列（5′→3′）	产物长度/bp
CAT	正向引物：GGAGGCGGGAACCCAATAG	102
	反向引物：GTGTGCCATCTCGTCAGTGAA	
GST	正向引物：TCTGCCCTACTTGATTGATGGG	117
	反向引物：TCCACACGAATCTTCTCCTCT	
Bcl-2	正向引物：GTCGCTACCGTCGTGACTTC	284
	反向引物：CAGACATGCACCTACCCAGC	
Bax	正向引物：TGAAGACAGGGGCCTTTTTG	140
	反向引物：AATTCGCCGGAGACACTCG	
caspase-3	正向引物：ATGGAGAACAACAAAACCTCAGT	74
	反向引物：TTGCTCCCATGTATGGTCTTTAC	
IL-1β	正向引物：ATGGAGAACAACAAAACCTCAGT	116
	反向引物：TGGATGCTCTCATCAGGACAG	
TNF-α	正向引物：CCTGTAGCCCACGTCGTAG	148
	反向引物：GGGAGTAGACAAGGTACAACCC	
IL-6	正向引物：CTGCAAGAGACTTCCATCCAG	131
	反向引物：AGTGGTATAGACAGGTCTGTTGG	
iNOS	正向引物：GGAGTGACGGCAAACATGACT	127
	反向引物：TCGATGCACAACTGGGTGAAC	

iNOS：诱导型一氧化氮合酶（inducible nitric oxide synthase）。

2.3.5　RAW264.7细胞中炎症因子水平检测

采用ELISA法检测。取RAW264.7细胞以1×10^6 mL^{-1}的密度接种至6孔板中，按照“2.3.1”项下方法进行分组和给药。收集细胞培养液，离心后取上清液，按照相应试剂盒说明书方法进行操作，使用酶标仪检测上清液中炎症因子IL-1β、TNF-α、IL-6水平。

2.3.6　RAW264.7细胞中炎症相关蛋白表达检测

采用Western blot法检测。取RAW264.7细胞以1×10^6 mL^{-1}的密度接种至6孔板中，按照“2.3.1”项下方法进行分组和给药。收集细胞，后续步骤同“2.3.3”项下（一抗改为NLRP3、cleaved-caspase-1）。

2.3.7　RAW264.7细胞中炎症因子mRNA表达检测

采用qPCR检测IL-1β、TNF-α、IL-6、iNOS mRNA的表达水平。取RAW264.7细胞以1×10^6 mL^{-1}的密度接种至6孔板中，按照“2.3.1”项下方法进行分组和给药。收集细胞，后续步骤同“2.3.4”项下，引物序列及产物长度见表1。

2.4　统计学处理

体外释放实验采用SPSS 26.0软件进行数据分析，其余实验采用Origin 2016软件进行数据分析。所有数据以$\bar{x}\pm s$表示，多组间比较采用方差分析，进一步两两比较采用LSD-t检验。检验水准$\alpha=0.05$。

3 结果

3.1 CPC-NPs的表征结果

3.1.1 粒径、Zeta电位、PDI的测定结果

CPC-NPs的粒径为(675.69±64.58)nm，Zeta电位为(−20.11±0.98)mV，PDI为0.455±0.010(n=3)。

3.1.2 EE和DL计算结果

CPC标准曲线的方程为A=0.298 7c+0.008 9(R^2=0.997)，其中A为吸光度，c为CPC浓度，线性范围为1～200 μg/mL。计算得到EE、DL分别为35.60%、16.13%。

3.1.3 紫外吸收光谱扫描结果

紫外吸收光谱扫描结果显示，CPC-NPs谱图与CPC谱图相似，CPC在620 nm波长处有特征峰，说明CPC-NPs载体形式可以实现CPC的载药，且不造成CPC结构的改变。结果见图1。

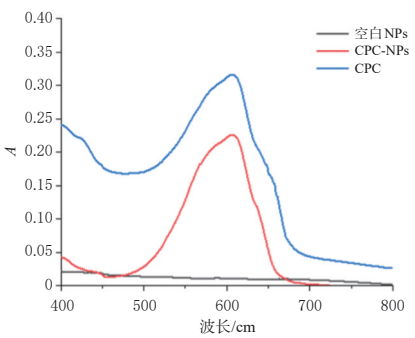


图1 CPC、空白NPs、CPC-NPs的紫外吸收光谱图

3.1.4 红外光谱扫描结果

红外光谱扫描结果显示，与空白NPs、CPC比较，CPC-NPs表面的化学键发生了变化，推测可能在1 364 cm^{-1}处形成了氢键，说明CMC与CPC可能发生了交联反应，并形成新的化学键。结果见图2。

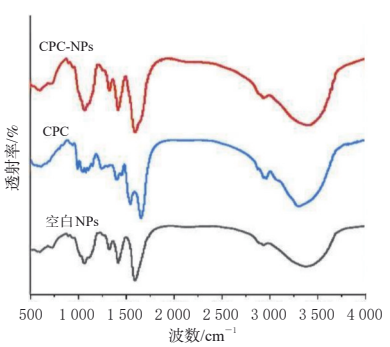


图2 CPC、空白NPs、CPC-NPs红外光谱图

3.1.5 NPs形态观察结果

透射电镜观察结果显示，CPC-NPs为规则的球形，有良好的分散性。结果见图3。

3.1.6 体外释放实验结果

体外释放实验结果显示，CPC-NPs中药物可持续释放30 h以上。CPC-NPs释放CPC的速度在12 h内较快，可能是因为CPC水溶性好，向缓冲溶液中释放的速度较快；18 h后药物释放较为平缓，可能是因为CMCS逐渐降解后，包裹在其中的CPC缓慢释放。结果见图4。

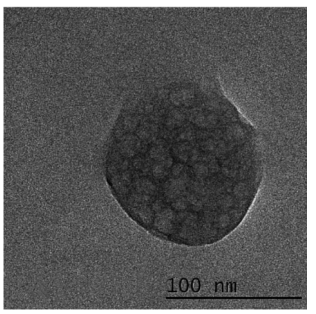


图3 CPC-NPs透射电镜图

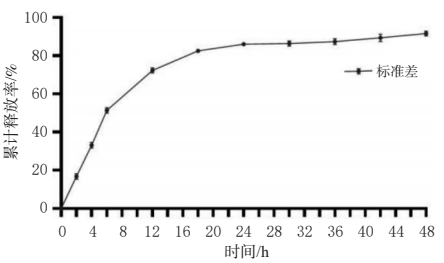


图4 CPC-NPs的体外释放曲线($\bar{x}\pm s$,n=3)

3.2 细胞实验结果

3.2.1 CPC-NPs对MLE-12细胞氧化应激指标的影响

与Con组比较，Mod组MLE-12细胞中的MDA水平显著升高(P<0.01)，T-AOC、SOD、CAT、GSH-Px水平均显著降低(P<0.01)。与Mod组比较，CPC-NPs各浓度组MLE-12细胞中的MDA水平均显著降低(P<0.01)，T-AOC、SOD、CAT(除CPC-NPs 30 μg/mL组外)、GSH-Px水平均显著升高(P<0.05或P<0.01)。结果见表2。

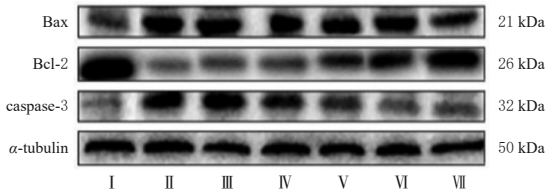
表2 各组MLE-12细胞氧化应激指标检测结果比较($\bar{x}\pm s$,n=3)

组别	T-AOC(U/g)	SOD(U/g)	CAT(U/mg)	GSH-Px(U/g)	MDA(mol/mg)
Con组	0.08±0.01	1.24±0.01	3.20±0.17	27.49±0.79	1.23±0.27
Mod组	0.04±0.01[a]	0.90±0.03[a]	1.41±0.02[a]	17.94±0.70[a]	2.27±0.43[a]
空白NPs组	0.04±0.01	0.91±0.03	1.42±0.03	18.12±0.73	2.41±0.46
CPC-NPs 30 μg/mL组	0.05±0.01[b]	1.06±0.03[b]	1.61±0.03	19.71±0.06[c]	1.88±0.32[b]
CPC-NPs 60 μg/mL组	0.05±0.01[b]	1.10±0.01[b]	1.76±0.28[b]	20.49±0.35[b]	1.60±0.02[b]
CPC-NPs 120 μg/mL组	0.06±0.01[b]	1.15±0.01[b]	1.99±0.02[b]	21.55±1.00[b]	1.39±0.15[b]
CPC-NPs 240 μg/mL组	0.06±0.01[b]	1.22±0.04[b]	2.54±0.33[b]	24.01±0.63[b]	1.32±0.21[b]

a：与Con组比较，P<0.01；b：与Mod组比较，P<0.01；c：与Mod组比较，P<0.05。

3.2.2 CPC-NPs对MLE-12细胞中凋亡相关蛋白表达的影响

与Con组比较，Mod组MLE-12细胞中caspase-3蛋白表达水平显著升高(P<0.01)，Bcl-2/Bax蛋白比值显著降低(P<0.01)。与Mod组比较，CPC-NPs各浓度组MLE-12细胞中caspase-3蛋白表达水平均显著降低(P<0.01)，Bcl-2/Bax蛋白比值均显著升高(P<0.01)。结果见图5、表3。



Ⅰ：Con组；Ⅱ：Mod组；Ⅲ：空白NPs组；Ⅳ：CPC-NPs 30 μg/mL组；Ⅴ：CPC-NPs 60 μg/mL组；Ⅵ：CPC-NPs 120 μg/mL组；Ⅶ：CPC-NPs 240 μg/mL组。

图5　各组MLE-12细胞中凋亡相关蛋白表达电泳图

表3　各组MLE-12细胞中caspase-3蛋白表达水平和Bcl-2/Bax蛋白比值比较（$\bar{x}\pm s$，$n=3$）

组别	caspase-3/α-tubulin	Bcl-2/Bax蛋白比值
Con组	1.27±0.03	1.36±0.05
Mod组	2.62±0.16[a]	0.38±0.03[a]
空白NPs组	2.73±0.09	0.33±0.03
CPC-NPs 30 μg/mL组	2.16±0.05[b]	0.51±0.02[b]
CPC-NPs 60 μg/mL组	1.94±0.05[b]	0.50±0.02[b]
CPC-NPs 120 μg/mL组	1.61±0.12[b]	0.57±0.05[b]
CPC-NPs 240 μg/mL组	1.75±0.05[b]	0.81±0.04[b]

a：与Con组比较，$P<0.01$；b：与Mod组比较，$P<0.01$。

3.2.3　CPC-NPs对MLE-12细胞中CAT、GST mRNA表达的影响

与Con组比较，Mod组MLE-12细胞中CAT mRNA表达水平显著降低（$P<0.01$）；GST mRNA表达水平略有降低，但差异无统计学意义（$P>0.05$）。与Mod组比较，CPC-NPs各浓度组细胞中CAT、GST mRNA表达水平均显著升高（$P<0.05$或$P<0.01$）。结果见表4。

表4　各组MLE-12细胞中CAT、GST mRNA表达水平比较（$\bar{x}\pm s$，$n=3$）

组别	CAT mRNA	GST mRNA
Con组	1.01±0.06	1.01±0.05
Mod组	0.25±0.01[a]	0.90±0.02
空白NPs组	0.27±0.02	0.90±0.02
CPC-NPs 30 μg/mL组	0.45±0.03[b]	1.50±0.17[c]
CPC-NPs 60 μg/mL组	0.56±0.02[b]	1.92±0.03[b]
CPC-NPs 120 μg/mL组	0.76±0.02[b]	4.15±0.35[b]
CPC-NPs 240 μg/mL组	0.88±0.05[b]	4.56±0.39[b]

a：与Con组比较，$P<0.01$；b：与Mod组比较，$P<0.01$；c：与Mod组比较，$P<0.05$。

3.2.4　CPC-NPs对MLE-12细胞中凋亡相关因子mRNA表达的影响

与Con组比较，Mod组MLE-12细胞中caspase-3 mRNA表达水平显著升高（$P<0.01$），Bcl-2/Bax mRNA比值显著降低（$P<0.01$）。与Mod组比较，CPC-NPs各浓度组MLE-12细胞中caspase-3 mRNA表达水平均显著降低（$P<0.01$），Bcl-2/Bax mRNA比值均显著升高（$P<0.01$）。结果见表5。

表5　各组MLE-12细胞中caspase-3 mRNA表达水平和Bcl-2/Bax mRNA比值比较（$\bar{x}\pm s$，$n=3$）

组别	caspase-3 mRNA	Bcl-2/Bax mRNA比值
Con组	0.97±0.02	1.03±0.02
Mod组	2.75±0.06[a]	0.10±0.01[a]
空白NPs组	2.81±0.02	0.11±0.01
CPC-NPs 30 μg/mL组	1.94±0.09[b]	0.22±0.04[b]
CPC-NPs 60 μg/mL组	1.65±0.01[b]	0.34±0.03[b]
CPC-NPs 120 μg/mL组	1.45±0.02[b]	0.56±0.02[b]
CPC-NPs 240 μg/mL组	1.40±0.04[b]	0.61±0.01[b]

a：与Con组比较，$P<0.01$；b：与Mod组比较，$P<0.01$。

3.2.5　CPC-NPs对RAW264.7细胞中炎症因子水平的影响

与Con组比较，Mod组RAW264.7细胞中IL-1β、TNF-α、IL-6水平均显著升高（$P<0.01$）。与Mod组比较，CPC-NPs各浓度组RAW264.7细胞中IL-1β、TNF-α、IL-6水平均显著降低（$P<0.01$）。结果见表6。

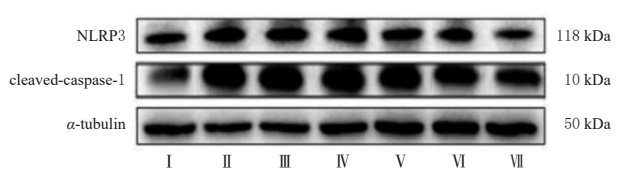
表6　各组RAW264.7细胞炎症因子指标检测结果比较（$\bar{x}\pm s$，$n=3$，pg/mL）

组别	IL-1β	TNF-α	IL-6
Con组	5.38±0.07	62.04±1.56	3.73±0.16
Mod组	15.80±0.17[a]	124.38±5.52[a]	506.43±8.30[a]
空白NPs组	13.13±0.14	124.69±8.55	505.16±13.61
CPC-NPs 30 μg/mL组	12.32±0.07[b]	105.17±7.26[b]	409.94±15.76[b]
CPC-NPs 60 μg/mL组	10.26±0.10[b]	96.81±1.10[b]	396.72±2.83[b]
CPC-NPs 120 μg/mL组	8.31±0.27[b]	88.90±3.00[b]	373.07±8.30[b]
CPC-NPs 240 μg/mL组	7.21±0.04[b]	99.15±1.72[b]	295.16±4.16[b]

a：与Con组比较，$P<0.01$；b：与Mod组比较，$P<0.01$。

3.2.6　CPC-NPs对RAW264.7细胞中炎症相关蛋白表达的影响

与Con组比较，Mod组RAW264.7细胞中NLRP3、cleaved-caspase-1蛋白表达水平均显著升高（$P<0.01$）。与Mod组比较，CPC-NPs各浓度组RAW264.7细胞中NLRP3、cleaved-caspase-1蛋白表达水平均显著降低（$P<0.01$）。结果见图6、表7。



Ⅰ：Con组；Ⅱ：Mod组；Ⅲ：空白NPs组；Ⅳ：CPC-NPs 30 μg/mL组；Ⅴ：CPC-NPs 60 μg/mL组；Ⅵ：CPC-NPs 120 μg/mL组；Ⅶ：CPC-NPs 240 μg/mL组。

图6　各组RAW264.7细胞中炎症相关蛋白表达电泳图

3.2.7　CPC-NPs对RAW264.7细胞中炎症因子mRNA表达的影响

与Con组比较，Mod组RAW264.7细胞中IL-1β、TNF-α、IL-6、iNOS mRNA表达水平均显著升高（$P<0.01$），其中IL-1β的mRNA表达水平倍增。与Mod组比较，CPC-NPs各浓度组IL-1β、TNF-α、IL-6、iNOS mRNA表达水平均显著降低（$P<0.05$或$P<0.01$）。结果见表8。

表7　各组RAW264.7细胞中炎症相关蛋白表达水平比较（$\bar{x}\pm s$，$n=3$）

组别	NLRP3/α-tubulin	cleaved-caspase-1/α-tubulin
Con组	1.08±0.04	0.99±0.06
Mod组	1.81±0.09[a]	2.49±0.08[a]
空白NPs组	1.92±0.09	2.41±0.06
CPC-NPs 30 μg/mL组	1.44±0.06[b]	1.87±0.07[b]
CPC-NPs 60 μg/mL组	1.28±0.03[b]	1.88±0.07[b]
CPC-NPs 120 μg/mL组	1.44±0.12[b]	1.70±0.02[b]
CPC-NPs 240 μg/mL组	1.21±0.03[b]	1.48±0.09[b]

a：与Con比较，$P<0.01$；b：与Mod比较，$P<0.01$。

表8　各组RAW264.7细胞中炎症因子mRNA表达水平比较（$\bar{x}\pm s$，$n=3$）

组别	IL-1β mRNA	TNF-α mRNA	IL-6 mRNA	iNOS mRNA
Con组	1.13±0.07	1.25±0.10	1.09±0.05	0.97±0.04
Mod组	50.22±4.31[a]	2.36±0.11[a]	4.99±0.28[a]	3.56±0.47[a]
空白NPs组	49.24±8.00	2.36±0.03	4.92±0.35	3.54±0.36
CPC-NPs 30 μg/mL组	30.14±0.32[b]	2.20±0.03[c]	4.16±0.07[b]	2.43±0.22[b]
CPC-NPs 60 μg/mL组	25.17±0.36[b]	1.91±0.03[b]	3.10±0.06[b]	1.96±0.07[b]
CPC-NPs 120 μg/mL组	15.87±1.00[b]	1.73±0.05[b]	2.36±0.02[b]	1.49±0.02[b]
CPC-NPs 240 μg/mL组	13.43±1.01[b]	1.59±0.04[b]	1.94±0.08[b]	1.40±0.05[b]

a：与Con比较，$P<0.01$；b：与Mod比较，$P<0.01$；c：与Mod比较，$P<0.05$。

4　讨论

CPC能够有效清除自由基，并显示出对组织炎症的抑制作用。为了提高CPC治疗肺部疾病的缓释和靶向性，需探索有效递送策略。肺泡能够截留比毛细血管直径更大的微粒，截留粒径在0.5～5 μm范围内，通过控制NPs的粒径，可以使其机械地被肺毛细血管截留，并被单核白细胞摄取进入肺组织或肺气泡，从而提高药物在肺部的浓度，这为静脉给药后实现肺部被动靶向治疗提供了一种新方法[18]。本研究制备的CPC-NPs粒径大小为（675.69±64.58）nm，符合肺泡区域截留粒径大小的要求，大大提高了CPC的肺靶向性。体外释放结果显示，CPC-NPs中药物可持续释放30 h以上，具有一定的缓释效果。以上结果表明本研究成功利用纳米技术构建了CPC-NPs，有望实现CPC的肺部靶向性与缓慢释放。

海水导致的急性肺损伤与氧化应激密切相关：海水进入肺中会诱导活性氧的过量产生，进而引起髓过氧化物酶和MDA的生成，使肺部氧化还原失衡[17]。Qiu等[19]研究表明，海水会显著降低肺上皮细胞的存活率，促进肺组织中活性氧、MDA的生成，并降低抗氧化酶的水平，引起氧化应激，造成肺损伤。Zhang等[20]研究表明，LPS诱导的急性肺损伤会使机体产生大量的活性氧并引起氧化应激，从而导致肺损伤，抑制氧化应激对LPS诱导的急性肺损伤有一定的改善作用。肺泡上皮细胞在维持肺泡正常形态和功能方面具有至关重要的作用，在肺损伤过程中，对肺组织的修复也起到了关键作用。本文为了更好地模拟临床海水淹溺的病理过程，通过LPS联合25%海水，建立急性肺损伤模型。结果显示，CPC-NPs可显著升高LPS联合海水处理后MLE-12细胞中T-AOC、SOD、CAT（除CPC-NPs 30 μg/mL外）、GSH-Px水平，显著降低MDA水平。这表明CPC-NPs可有效减轻LPS联合海水处理后MLE-12细胞的氧化应激反应。

凋亡是细胞受基因调控的程序性死亡过程。*Bcl-2*基因是一种抗凋亡基因，其蛋白Bcl-2提高细胞存活率的途径可能是凭借将caspase蛋白转移至细胞内膜，抑制其活性；此外，在线粒体中Bcl-2蛋白还可以抑制一部分caspase活化剂的表达[21]。本研究结果显示，CPC-NPs可显著升高LPS联合海水处理后MLE-12细胞中Bcl-2/Bax蛋白比值及其mRNA比值，显著降低caspase-3蛋白及其mRNA表达水平。这表明CPC-NPs可有效减轻LPS联合海水处理后MLE-12细胞的凋亡情况。

急性肺损伤发生后，中性粒细胞在肺部聚集，多种炎症因子引发炎症反应，加剧肺损伤进程，其中肺巨噬细胞扮演着调节炎症因子合成与释放的重要角色[22]。本研究结果显示，CPC-NPs可显著降低LPS联合海水处理后RAW264.7细胞中IL-1β、TNF-α、IL-6水平及其mRNA表达，iNOS mRNA表达，以及炎症相关蛋白NLRP3和cleaved-caspase1的表达。这表明CPC-NPs可有效减轻LPS联合海水处理后RAW264.7细胞的炎症反应。

综上所述，本研究成功制备了具有肺靶向性和缓释性的CPC-NPs。CPC-NPs可以通过抗氧化应激及抑制细胞凋亡和炎症反应来缓解LPS联合海水诱导的急性肺损伤。后续将考虑进行体内动物实验，并进一步探究其具体调控机制。

参考文献

[1] LI P C，WANG B R，LI C C，et al. Seawater inhalation induces acute lung injury via ROS generation and the endoplasmic reticulum stress pathway[J]. Int J Mol Med，2018，41(5)：2505-2516.

[2] 孔凯文，孟岩，邓小明. 海水淹溺性肺损伤机制的研究进展[J]. 海军军医大学学报，2023，44(3)：349-355.
KONG K W，MENG Y，DENG X M. Mechanism of seawater drowning-induced lung injury：research progress[J]. Acad J Nav Med Univ，2023，44(3)：349-355.

[3] ROBERT A，DANIN P É，QUINTARD H，et al. Seawater drowning-associated pneumonia：a 10-year descriptive cohort in intensive care unit[J]. Ann Intensive Care，2017，7(1)：45.

[4] SATO K，KADIISKA M B，GHIO A J，et al. *In vivo* lipid-derived free radical formation by NADPH oxidase in acute lung injury induced by lipopolysaccharide：a model

for ARDS[J]. FASEB J,2002,16(13):1713-1720.

[5] ZHANG L F,KONG D Y,HUANG J X,et al. The Therapeutic effect and the possible mechanism of C-phycocyanin in lipopolysaccharide and seawater-induced acute lung injury[J]. Drug Des Devel Ther,2022,16:1025-1040.

[6] YUAN B,LI Z X,SHAN H H,et al. A review of recent strategies to improve the physical stability of phycocyanin[J]. Curr Res Food Sci,2022,5:2329-2337.

[7] 刘昊泽,张善林,马微,等.螺旋藻藻蓝蛋白对乙醇致氧化应激小鼠抗氧化能力的影响[J].中国生物制品学杂志,2023,36(11):1301-1305.
LIU H Z,ZHANG S L,MA W,et al. Effects of Spirulina phycocyanin on antioxidant capacity of ethanol-induced oxidative stress mice[J]. Chin J Biol,2023,36(11):1301-1305.

[8] VANESSA B,NIKITA D M,PLACIDO R,et al. C-phycocyanin prevents acute myocardial infarction-induced oxidative stress,inflammation and cardiac damage[J]. Pharm Biol,2022,60(1):755-763.

[9] HUANG C W,HUANG D X,HUANG D S,et al. C-phycocyanin suppresses cell proliferation and promotes apoptosis by regulating the AMPK pathway in NCL-H292 non-small cell lung cancer cells[J]. Folia Biol,2022,68(1):16-24.

[10] 李新月,赵猛,丁子康,等.藻蓝蛋白对环磷酰胺致小鼠肝肾损伤的保护作用[J].食品工业科技,2023,44(10):379-386.
LI X Y,ZHAO M,DING Z K,et al. Protective effect of phycocyanin on cyclophosphamide-induced immunocompromised mice[J]. Sci Technol Food Ind,2023,44(10):379-386.

[11] ANITHA A,SREERANGANATHAN M,CHENNAZHI K P,et al. *In vitro* combinatorial anticancer effects of 5-fluorouracil and curcumin loaded N,O-carboxymethyl chitosan nanoparticles toward colon cancer and *in vivo* pharmacokinetic studies[J]. Eur J Pharm Biopharm,2014,88(1):238-251.

[12] 袁廷勋,何欣雨,王佳齐,等.抗结核抗菌肽及其纳米药物递送系统的研究进展[J].中国人兽共患病学报,2023,39(8):805-813.
YUAN T X,HE X Y,WANG J Q,et al. Research progress in anti-tuberculosis antimicrobial peptides and their nano drug delivery systems[J]. Chin J Zoonoses,2023,39(8):805-813.

[13] 姜良乾.藻蓝蛋白及靶向纳米微球C-PC/CMC-CD59sp的抗乳腺癌分子机制研究[D].青岛:青岛大学,2019.
JIANG L Q. Molecular mechanism of anti-breast cancer activity of phycocyanin and targeting nano-drug C-PC/CMC-CD59sp[D].Qingdao:Qingdao University,2019.

[14] LIU G X,XU X H,JIANG L Q,et al. Targeted antitumor mechanism of C-PC/CMC-CD55sp nanospheres in HeLa cervical cancer cells[J]. Front Pharmacol,2020,11:906.

[15] 刘慧慧.CPC/CMC-CD55sp纳米微球对Caski细胞体外抑增殖和促凋亡作用研究[D].青岛:青岛大学,2019.
LIU H H. CPC/CMC-CD55sp nanoparticles inhibit proliferation and apoptosis of Caski cells *in vitro*[D]. Qingdao:Qingdao University,2019.

[16] 孔德一.藻蓝蛋白对脂多糖并海水吸入性肺损伤的保护作用及其机制研究[D].舟山:浙江海洋大学,2022.
KONG D Y. The protective effect and mechanism of phycocyanin in lipopolysaccharide and seawater inhalation-induced lung injury[D].Zhoushan:Zhejiang Ocean University,2022.

[17] 陈敏,金发光.海水吸入型急性肺损伤发病机制的研究进展[J].山西医科大学学报,2022,53(8):1041-1043.
CHEN M,JIN F G. Research progress on the pathogenesis of acute lung injury induced by seawater inhalation[J]. J Shanxi Med Univ,2022,53(8):1041-1043.

[18] 张鸿宇,金银秀,朱玥,等.肺靶向抗肿瘤药物新剂型研究进展[J].广州化工,2022,50(9):23-24.
ZHANG H Y,JIN Y X,ZHU Y,et al. Research progress on new dosage forms of lung targeted antitumor drugs[J]. Guangzhou Chem Ind,2022,50(9):23-24.

[19] QIU Y B,WAN B B,LIU G,et al. Nrf2 protects against seawater drowning-induced acute lung injury via inhibiting ferroptosis[J]. Respir Res,2020,21(1):232.

[20] ZHANG Q Q,FENG A,ZENG M N,et al. Chrysosplenol D protects mice against LPS-induced acute lung injury by inhibiting oxidative stress,inflammation,and apoptosis via TLR4-MAPKs/NF-κB signaling pathways[J]. Innate Immun,2021,27(7/8):514-524.

[21] 李冰.钝顶螺旋藻/节旋藻藻蓝蛋白的提取纯化及抗肿瘤免疫效应研究[D].青岛:中国海洋大学,2006.
LI B. Research on the extraction,purification and antitumor immune activity of phycocyanin from spirulina platensis/arthrospira platensis[D].Qingdao:Ocean University of China,2006.

[22] 张敏,李思聪,王斌,等.川射干提取物调节TLR4/NF-κB信号通路缓解LPS诱导的小鼠急性肺损伤的研究[J].黑龙江畜牧兽医,2023(23):103-109.
ZHANG M,LI S C,WANG B,et al. Modulation of TLR4/NF-κB signaling pathway by Iridis Tectori Rhizoma extract alleviates LPS-induced acute lung injury in mice[J]. Heilongjiang Anim Sci Vet Med,2023(23):103-109.

（收稿日期:2024-01-06　修回日期:2024-05-19）
（编辑:舒安琴）