• 基础研究 •

ReN细胞来源纳米囊泡中的let-7i-5p在帕金森病模型中通过抗凋亡作用发挥保护效应

魏甲园[1]，徐圣业[1]，朱妍妍[1]，齐　翠[1]，尤卫艳[1*]，高　隽[1,2*]

[1]南京医科大学基础医学院神经生物学系，江苏　南京　211166；[2]复旦大学附属口腔医院（上海市口腔医院）口腔融合创新研究中心，上海　200001

［摘　要］ **目的**：探究人类神经干细胞系ReN细胞来源的纳米囊泡（nanovesicle，NV）对帕金森病（Parkinson's disease，PD）的神经保护作用及其潜在分子机制。**方法**：使用1-甲基-4-苯基-1，2，3，6-四氢吡啶（1-methyl-4-phenyl-1，2，3，6-tetrahydro-pyridine，MPTP）20 mg/kg腹腔注射C57BL/6小鼠，建立PD小鼠模型，并通过尾静脉注射挤压ReN细胞获得的NV（ReN-NV）及经狂犬病病毒糖蛋白肽（rabies virus glycoprotein，RVG）表面修饰的ReN-NV（RVG-ReN-NV）进行干预。采用转棒实验和爬杆实验评估小鼠运动功能变化，并通过免疫荧光染色检测小鼠黑质区域的酪氨酸羟化酶（tyrosine hydroxylase，TH）、小胶质细胞标志物Iba1的表达，以及纹状体区域TH的表达；利用蛋白免疫印迹法检测纹状体区域的TH蛋白水平。使用1-甲基-4-苯基吡啶阳离子（1-methyl-4-phenylpyridinium ion，MPP^+）1 mmol/L处理人神经母细胞瘤细胞SH-SY5Y，构建PD细胞模型，分别通过CCK-8法检测细胞活力，乳酸脱氢酶（lactate dehydrogenase，LDH）法评估细胞毒性，蛋白免疫印迹法检测Bcl-2和Bax的蛋白表达。**结果**：行为学实验结果显示，MPTP处理后小鼠爬杆掉落潜伏期缩短及总下杆时间延长，提示帕金森样运动功能障碍形成。免疫荧光染色结果显示，ReN-NV能够改善MPTP诱导的小鼠黑质及纹状体TH阳性神经元减少，并降低黑质区域Iba1表达；其中RVG-ReN-NV干预组改善效果更为显著。蛋白免疫印迹结果表明，ReN-NV可上调纹状体TH蛋白表达水平。体外实验结果显示，ReN-NV能够提高MPP^+诱导的SH-SY5Y细胞活力，降低LDH释放水平，并上调抗凋亡蛋白Bcl-2表达、下调促凋亡蛋白Bax表达。**结论**：ReN-NV对MPTP/MPP^+诱导的PD模型具有显著神经保护作用，且经RVG修饰可进一步增强其脑靶向保护效果，其机制可能与let-7i-5p介导的抑制细胞凋亡途径有关。

［关键词］ 外泌体；帕金森病；纳米囊泡；狂犬病毒糖蛋白肽

［中图分类号］ R742.5　　［文献标志码］ A　　［文章编号］ 1007-4368（2026）09-1303-12

doi：10.7655/NYDXBNSN260218

The let-7i-5p in ReN cell-derived nanovesicles exerts neuroprotective effects *via* anti-apoptotic mechanisms in Parkinson's disease models

WEI Jiayuan[1]，XU Shengye[1]，ZHU Yanyan[1]，QI Cui[1]，YOU Weiyan[1*]，GAO Jun[1,2*]

[1]Department of Neurobiology，School of Basic Medical Sciences，Nanjing Medical University，Nanjing 211166；[2]Center for Dental Integration Innovation and Research，Shanghai Stomatological Hospital，Fudan University，Shanghai 200001，China

［**Abstract**］ **Objective**：To investigate the neuroprotective effects of nanovesicles（NVs）derived from the human neural stem cell line ReN cell and to explore the underlying molecular mechanisms in Parkinson's disease（PD）. **Methods**：PD mouse models were established in C57BL/6 mice by intraperitoneal injection of 20 mg/kg 1-methyl-4-phenyl-1，2，3，6-tetrahydropyridine（MPTP）. Mice were treated *via* tail vein injection with nanovesicles obtained from extruded ReN cells（ReN-NV）or RVG peptide-modified ReN-NV（RVG-ReN-NV）. Motor function was evaluated by the rotarod test and the pole test，and immunofluorescence staining was performed to assess the expression of tyrosine hydroxylase（TH）and the microglial marker Iba1 in the substantia nigra，as well as TH expression

［基金项目］ 国家自然科学基金（32371053，81973308）；江苏省高校自然科学基金（18KJB180017）

*通信作者（Corresponding author），E-mail：youweiyan@njmu.edu.cn（ORCID：0009-0002-6487-9176）；gaojun_kq@fudan.edu.cn（ORCID：0000-0002-5925-537X）

in the striatum. Western blot analysis was used to determine TH protein levels in the striatum. *In vitro*, a PD cell model was established by treating human neuroblastoma SH-SY5Y cells with 1 mmol/L 1-methyl-4-phenylpyridinium ion (MPP^+). Cell viability was assessed using the CCK-8 assay, cytotoxicity was evaluated by lactate dehydrogenase (LDH) release assay, and the protein expression levels of Bcl-2 and Bax were measured by Western blotting. **Results:** The behavioral results showed that MPTP-treated mice displayed a significantly reduced latency to fall during the pole test, accompanied by an increased total descent time, suggesting the establishment of Parkinsonian-like motor impairment. Immunofluorescence analysis showed that ReN-NV alleviated the loss of TH-positive neurons in the substantia nigra and striatum induced by MPTP and reduced Iba1 expression in the substantia nigra, with RVG-ReN-NV exhibiting a more pronounced protective effect. Western blot analysis demonstrated that ReN-NV upregulated TH protein expression in the striatum. *In vitro* experiments showed that ReN-NV increased the viability of MPP^+-treated SH-SY5Y cells, reduced LDH release, upregulated the expression of the anti-apoptotic protein Bcl-2, and downregulated the expression of the pro-apoptotic protein Bax. **Conclusion:** ReN cell-derived nanovesicles exert significant neuroprotective effects in MPTP/MPP^+-induced PD models. RVG modification further enhances their brain-targeting protective efficacy, and the underlying mechanism may be associated with let-7i-5p-mediated inhibition of apoptotic pathways.

[**Key words**] exosomes; Parkinson's disease; nanovesicles; rabies virus glycoprotein peptide

[J Nanjing Med Univ, 2026, 46(09): 1303-1314]

帕金森病(Parkinson's disease, PD)又称震颤麻痹,是一种常见于中老年人的神经退行性疾病,其病变主要位于黑质与纹状体区域。研究表明,高龄是PD的重要发病因素之一。随着年龄增长,纹状体多巴胺神经元逐渐发生退行性变,同时过氧化氢酶活性降低,导致体内氧化过程加速,多种因素共同作用使得PD发病率显著上升[1-2]。目前,PD的治疗主要依赖药物干预,常用药物包括左旋多巴和多巴胺受体激动剂等[3-4]。然而,该类治疗多为对症治疗,长期疗效有限。其重要原因之一在于多巴胺本身无法透过血脑屏障,临床上需依赖其前体左旋多巴进入中枢神经系统后再转化为多巴胺,从而发挥作用。此外,丘脑下核深部脑电刺激也是一种治疗PD并发运动波动和运动障碍的有效方法,其作用机制是通过改善左旋多巴反应性运动体征,以减少药物的使用,从而减轻左旋多巴诱导的运动障碍[5]。近年来的研究表明,外泌体在PD小鼠模型中具有显著的神经保护作用,可有效减轻疾病相关的病理损伤[6]。外泌体是一类直径30~200 nm的小型囊泡,内含DNA、RNA、蛋白质等多种生物因子[7-8],并能够穿透血-脑屏障[7,9]。研究发现,外泌体在免疫调节[10]、炎症反应调控[11]以及神经修复[12]等生理和病理过程中发挥着关键作用。然而,外泌体在临床转化应用中仍面临重要挑战,主要原因是其从供体细胞中分离获得的产量极为有限[13]。基于此,具有外泌体相似结构和生物学功能的外泌体模拟纳米囊泡(nanovesicle, NV)作为一种人工制备的仿生囊泡逐渐受到关注。该NV不仅保留了外泌体可穿透血-脑屏障的优势,而且制备过程相对简单,产量约为天然外泌体的100倍。此外,通过挤压法制备的NV具有较高的粒径均一性和良好的稳定性[14]。为实现更精准的中枢神经系统靶向递送,研究人员常对囊泡表面进行功能化修饰。狂犬病病毒糖蛋白(rabies virus glycoprotein, RVG)是狂犬病病毒膜上插入的一个65 kDa的三聚体Ⅰ型糖蛋白[15]。RVG肽是从RVG受体识别关键序列中衍生的由29个氨基酸组成的短肽,具有低免疫原性,可与不同来源的外泌体结合,介导其中枢神经系统靶向递送,增加受体细胞摄取,减少药物脱靶效应等优点[16-17]。因此,使用外泌体及其仿生囊泡探索PD发病机制、挖掘潜在的治疗靶点,成为当前研究的热点。研究表明,NV内富含微小RNA(microRNA, miRNA)[18],而miRNA在包括PD在内的多种神经退行性疾病的发病机制中发挥重要作用。miRNA不仅可能作为PD的诊断标志物,靶向特定miRNA也可能成为PD的潜在治疗策略[19]。ReNcell VM细胞(下文简称ReN细胞)是一种源自人类胎儿大脑腹侧中脑区域的神经祖细胞系,具有良好的干细胞特性,即使在长时间传代(>45代)后仍能保持正常的二倍体核型和分化潜能[20]。鉴于ReN细胞的上述特性,以及干细胞在PD治疗中已展现出的广阔应用前景和潜在疗效[21],本研究通过挤压法制备ReN细胞来源的NV(ReN-NV),并进一步经RVG肽修饰获得RVG-ReN-NV;借助小鼠及细胞PD模型,评估两种囊泡的神经保护作用,并探究其分子机制,为ReN-NV和RVG-ReN-NV在PD治疗中的应用提供新证据。

1　材料和方法

1.1　材料

实验动物均为南京医科大学医药实验动物中心提供的野生型C57BL/6小鼠，饲养在SPF级动物房；人神经母细胞瘤细胞SH-SY5Y由南京大学模式动物研究所石云教授赠予；ReN细胞和PVDF膜购于美国Millipore公司；tdTomato标记的外泌体由美国马萨诸塞州综合医院Dr Bakhos Tannous提供；B细胞淋巴瘤（B-cell lymphoma，Bcl）-2抗体、Bcl-2相关X蛋白（Bcl-2 associated X protein，Bax）抗体、β-actin抗体、α-微管蛋白（α-tubulin）抗体及热休克蛋白70（heat shock protein 70，HSP70）抗体（南京巴傲得生物科技有限公司）；RIPA裂解液、DAPI、酪氨酸羟化酶（tyrosine hydroxylase，TH）抗体、1-甲基-4-苯基-1，2，3，6-四氢吡啶（1-methyl-4-phenyl-1，2，3，6-tetrahydro-pyridine，MPTP）和1-甲基-4-苯基吡啶阳离子（1-methyl-4-phenylpyridinium ion，MPP^+）（Sigma公司，美国）；细胞消化液Accutase、胎牛血清、B-27、谷氨酰胺和青霉素链霉素双抗（Thermo Fisher公司，美国）；DMEM/F12培养基（南京凯基生物技术股份有限公司）；碱性成纤维细胞生长因子2（basic fibroblast growth factor 2，bFGF2）和表皮生长因子（epidermal growth factor，EGF）（PeproTech公司，美国）；小胶质细胞BV2、let-7i-5p模拟物（let-7i-5p mimic）、小胶质细胞标志物Iba1抗体和半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-3（cysteine-dependent aspartate-specific protease-3，Caspase-3）抗体（上海吉玛制药技术有限公司）。0.2、0.4、1.0 μm聚碳酸酯多孔膜和支持膜（Whatman公司，英国）；CCK-8测定试剂盒、RIPA裂解液、反转录试剂盒和荧光定量检测试剂盒均（上海碧云天生物技术有限公司）；BCA蛋白质定量试剂盒（Pierce公司，美国）。

1.2　方法

1.2.1　ReN细胞培养和分化

ReN细胞培养于DMEM/F12高糖培养基中，该培养基添加了2% B-27、谷氨酰胺、1%青霉素-链霉素、20 μg/mL EGF和20 μg/mL bFGF2。所有细胞均置于37 ℃、5%CO_2条件下的培养箱中培养[22]。待ReN细胞在上述培养基中生长形成单个神经球，转移至未包被的培养皿（60 mm×15 mm）中继续培养，在培养基成分不变的情况下培养3~4 d后，收集细胞球用于NV分离，本研究中培养的ReN细胞分泌的所有NV均分离自传代15~30代的细胞。

ReN细胞分化：将消化后的细胞以3×10^4个/cm^2的密度接种于24孔板内的盖玻片上，在生长培养基中培养3~4 d直至细胞融合。随后将培养基更换为不含生长因子的培养基，诱导细胞分化。

1.2.2　NV制备和鉴定

首先使用Accutase分离收集后的ReN细胞球，超声裂解得到细胞匀浆，300 *g*离心10 min，1 200 *g*离心20 min，再用10 000 *g*离心30 min，去除细胞和碎片。所得上清依次通过1 μm、400 nm、200 nm的聚碳酸酯多孔膜进行挤压过滤，再采用160 000 *g*超离心120 min分离NV，并在PBS中以相同的超离心条件进行洗涤，最后将NV重悬于PBS中，通过BCA法测定总蛋白质浓度。将得到的NV采用纳米颗粒跟踪分析系统（nanoparticles tracking analysis system，NTA）（Particle Metrix GmbH公司，德国）对NV的粒径和浓度进行定量分析[22]。

1.2.3　PD模型建立和分组处理

动物模型：选用8~10周龄的C57BL/6小鼠，通过腹腔注射20 mg/kg MPTP，连续给药5 d，构建急性PD小鼠模型。

分组处理：适应性喂养1~2周后，随机分为4组（n=3）。①Control组：造模阶段腹腔注射20 mg/kg PBS；治疗阶段于1、3、5、7、9 d尾静脉注射100 μL PBS。②MPTP+PBS组：腹腔注射20 mg/kg MPTP造模；治疗阶段于1、3、5、7、9 d尾静脉注射100 μL PBS。③MPTP+ReN-NV组（MPTP+RV组）：腹腔注射20 mg/kg MPTP造模；治疗阶段于1、3、5、7、9 d尾静脉注射溶于100 μL PBS中的100 μg未经修饰的ReN-NV。④MPTP+RVG-ReN-NV组（MPTP+RVG-RV组）：腹腔注射20 mg/kg MPTP造模；治疗阶段于1、3、5、7、9 d尾静脉注射溶于100 μL PBS中的100 μg RVG-ReN-NV。15 d后进行心脏灌流，收集血清及保存脑备用。动物实验已获得南京医科大学实验动物伦理委员会批准（编号：IACUC-1601153、IACUC-2303006）。

1.2.4　转棒实验

建模前3 d开始对小鼠进行适应性训练，每天训练3次，每次10 min，使小鼠熟悉实验环境及转棒操作流程。建模完成后第1天进行正式测试。实验时将小鼠置于转棒仪上，转棒初始速度设为4 r/min，并逐渐加速至30 r/min，加速度为20 r/min，总测试时间为300 s。记录小鼠自转棒上掉落的总时间。每只小鼠连续测试3次，每次测试间隔30 min。最终取3次测试结果的平均值作为该小鼠的转棒实验

结果。

1.2.5　爬杆实验

建模前3 d开始对小鼠进行适应性训练，每天训练3次，每次10 min，使其熟悉爬杆操作。实验装置为1根长60 cm、半径0.5 cm的垂直钢杆，钢杆顶端设有半径1.2 cm的球形突起。正式测试时，将小鼠头部朝上置于球形突起顶部，记录其自钢杆顶端爬至底端着地所需的总时间。每只小鼠测试3次，每次测试间隔30 min，取3次结果的平均值作为最终爬杆总时间。

1.2.6　免疫荧光染色

为研究NV在小鼠脑组织中的定位及其与不同细胞类型的关系，通过尾静脉注射由tdTomato标记的NV或RVG-NV。麻醉小鼠，用预冷的PBS以及用PBS配制的4% 多聚甲醛（paraformaldehyde，PFA，pH 7.4）心脏灌流。灌流后取脑组织在4% PFA中浸泡过夜，在30%蔗糖溶液中脱水48 h，待脑组织沉底后用OCT包埋，冰冻切片机上制备厚度25 μm的冰冻组织切片，−80 ℃冰箱保存备用。将脑组织冰冻切片置于含有0.5% Triton X-100的PBS中，摇床上放置30 min，随后在0.1% Triton X-100的PBS（PBST）配制的3% BSA中封闭2 h，加入一抗（TH抗体，1∶500；Iba1抗体，1∶1 000）4 ℃孵育过夜。PBST清洗3次，每次5 min，样品加二抗（山羊抗兔二抗，1∶500；山羊抗鼠二抗，1∶2 000）在室温下孵育1 h后，PBST清洗3次，每次10 min，最后用DAPI染色5 min。PBS清洗3次，每次5 min，甘油封片。共聚焦显微镜下拍摄，并用Image J进行分析。

1.2.7　蛋白质免疫印迹实验（Western blot）

组织样品：在对不同组（Control组、MPTP+PBS组、MPTP+RV组和MPTP+RVG-RV组）小鼠处理满15 d后，将小鼠麻醉再快速断头取脑，对脑解剖取纹状体组织加入RIPA裂解液，充分裂解后以12 000 r/min 4 ℃离心15 min，取上清用BCA方法进行蛋白质浓度测定。将每份样品等量蛋白原液用上样缓冲液制备蛋白样品，95 ℃煮10 min，使其变性。在配制好的聚丙烯酰胺凝胶中上样5~20 μg，采用80 V电压，使得蛋白样品在浓缩胶中浓缩，待样品跑至分离胶后，将电压调至120 V，持续电泳，直至样品跑至凝胶底部。电泳结束后，将蛋白转移至PVDF膜上，排去气泡后，0.3 A恒流转膜1 h。将PVDF膜在脱脂奶粉溶液中封闭1 h后，按照分子量裁开，分别在一抗（TH抗体，1∶2 000；β-actin抗体，1∶1 000；Bcl-2抗体，1∶1 000；Bax抗体，1∶1 000；α-tubulin抗体，1∶2 000；Caspase-3抗体，1∶1 000；HSP70抗体，1∶1 000）中4 ℃孵育过夜。次日用含有0.1 % Tween-20的TBS（TBST）清洗膜3次，每次5 min，用二抗（HRP标记的山羊抗兔，1∶10 000）室温下孵育条带1 h，用TBST漂洗3次，每次10 min。带有蛋白的条带在显影液ECL high-sig Western blotting substrate浸染，利用ECL Plus detection systems显影，并使用Image J软件分析。

细胞样品：将收取的转染NC/let-7i-5p mimic经过不同处理（PBS或MPP^+）的SH-SY5Y细胞，用PBS清洗两遍，加入适量的全细胞裂解液（加入蛋白酶抑制剂）在冰上裂解30 min后，转移至1.5 mL EP管中，4 ℃离心，12 000 r/min，15 min。取上清，用BCA方法进行蛋白质浓度测定。剩余步骤与上述一致。

1.2.8　细胞建模和分组

将SH-SY5Y细胞培养于含10%胎牛血清的DMEM高糖培养基中，置于37 ℃、5% CO_2的培养箱内。为了建立PD的体外细胞模型，使用不同浓度（0.25、0.50、1.00、2.00 mmol/L）的MPP^+处理SH-SY5Y细胞24 h。

为明确ReN-NV在体外的直接神经保护作用，将SH-SY5Y细胞随机分为3组：Control组，细胞正常培养，不给予任何特殊处理；MPP^+组，给予1 mmol/L MPP^+处理24 h构建损伤模型；MPP^++RV组，在给予1 mmol/L MPP^+处理的同时，加入10 μg/mL ReN-NV共同孵育24 h。

为明确let-7i-5p的抗凋亡作用，将SH-SY5Y细胞随机分为4组：NC组、Mimic组、NC+MPP^+组、Mimic+MPP^+组。待SH-SY5Y细胞融合至40%时，将室温孵育5 min后的Lipofectamine 2000分别与let-7i-5p NC mimic、let-7i-5p mimic混匀（转染浓度：50 nmol/L），缓慢加入无血清培养基内，每孔加入2 mL，37 ℃、5% CO_2的孵箱内孵育4~6 h后更换为正常含血清培养基，转染完成24 h后加入1 mmol/L MPP^+干预24 h。

BV2细胞采用DMEM培养基培养，培养基中含10%胎牛血清、1%青霉素-链霉素（100 U/mL）双抗溶液。细胞置于37 °C、5% CO_2的培养箱中恒温培养，待生长汇合至70%~80%传代、接种细胞。

为明确let-7i-5p的抗炎症作用，将BV2细胞随机分为4组：NC组、Mimic组、NC+MPP^+组、Mimic+MPP^+组。待细胞融合至40%时，将室温孵育5 min后的Lipofectamine 2000分别与let-7i-5p NC mimic、let-7i-5p mimic混匀（转染浓度：50 nmol/L），缓慢加入无

血清培养基内，每孔加入2 mL，37 ℃、5% CO_2的培养箱内孵育4~6 h后更换为正常含血清培养基，转染完成24 h后加入1 mmol/L MPP^+干预24 h。

1.2.9　CCK-8及乳酸脱氢酶（lactate dehydrogenase，LDH）法检测细胞活力

CCK-8法检测细胞活力：在96孔板中每孔接种100 μL SH-SY5Y细胞悬液，细胞密度为10%~30%，待贴壁后转染不同质粒，随后加1 mmol/L的MPP^+处理24 h。在避光条件下每孔加入10 μL CCK-8溶液，小心摇匀后将其放置于细胞培养箱中30 min，在450 nm波长下用紫外分光光度仪测定吸光值。

LDH释放检测：将细胞以5×10^5个/mL种植于96孔板中，每个孔板中加入100 μL培养液，在37 ℃、5% CO_2浓度的细胞培养箱中培养30 min后，按照试剂盒说明书收集各组的上清液80 μL，每孔加入40 μL Working Solution，室温避光孵育30 min。在490 nm波长处检测其吸光值，计算细胞内LDH释放量。

1.2.10　实时荧光定量聚合酶链反应（real-time quantitative polymerase chain reaction，RT-qPCR）

为评估let-7i-5p对小胶质细胞激活状态的影响，采用RT-qPCR检测BV2细胞中炎症因子白细胞介素（interleukin，IL）-6和IL-1β的mRNA表达水平。各组细胞分别转染NC或let-7i-5p mimic，转染12 h后，NC+MPP^+组和Mimic+MPP^+组加入MPP^+（1 mmol/L）继续处理24 h，以模拟PD相关炎症微环境，NC组和Mimic组则加入PBS作为对照。使用TRIzol试剂提取总RNA，并通过分光光度计检测RNA的浓度和纯度。按照试剂盒说明书将总RNA逆转录为cDNA，随后采用SYBR Green法在实时荧光定量PCR仪上进行扩增反应。以GAPDH作为内参，基因的相对表达水平采用$2^{-\Delta\Delta Ct}$方法进行计算。引物由上海吉玛生物公司合成，序列见表1。

表1　引物序列

Table 1　Primer sequences

Gene	Primer sequence（5′→3′）
let-7i-5p mimic	F：UGAGGUAGUAGUUUGUGCUGUU
	R：CAGCACAAACUACUACCUCAUU
IL-1β	F：GCAACTGTTCCTGAACTCAACT
	R：ATCTTTTGGGGTCCGTCAACT
IL-6	F：TAGTCCTTCCTACCCCAATTTCC
	R：TTGGTCCTTAGCCACTCCTTC
GAPDH	F：AAGAGGGATGCTGCCCTTAC
	R：TACGGCCAAATCCGTTCACA

1.3　统计学方法

使用GraphPad Prism 10.1.2软件对实验数据进行统计分析，数据用均值±标准差（$\bar{x}\pm s$）表示。两组间数据比较应用Student's t检验，多组间数据比较用单因素方差分析（one-way ANOVA）或双因素方差分析（two-way ANOVA），并用Tukey法进行事后组间两两比较，$P<0.05$为差异有统计学意义。

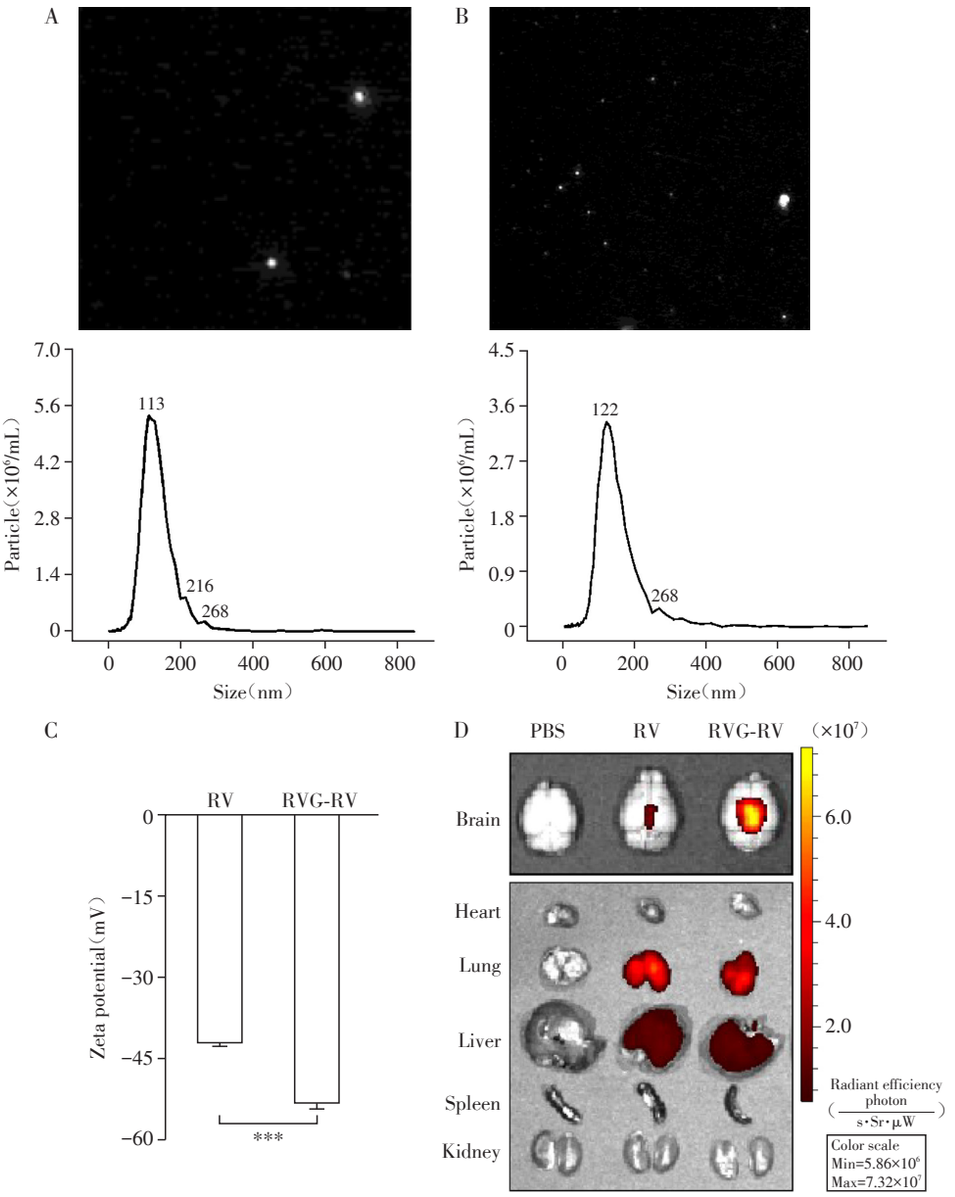
2　结　果

2.1　ReN-NV及RVG-ReN-NV的物理特性鉴定

为明确ReN-NV及RVG-ReN-NV的基本物理特性，进行了形态学与粒径表征。通过透射电子显微镜观察，两种囊泡均呈现典型的杯状或球形膜结构，符合细胞外囊泡的形态学特征。进一步通过NTA测定其粒径分布，结果显示，ReN-NV和RVG-ReN-NV的粒径峰值均集中在100~200 nm（图1A、B）。这些数据表明，通过细胞挤压法成功制备了具有标准物理特性的NV。经RVG肽修饰后，纳米颗粒表面电荷负性显著增强（图1C），说明RVG的引入使颗粒表面带电性增强，表面结构发生了明显改变，提示RVG成功修饰在载体表面。为评估其体内分布特性，通过荧光成像观察了不同处理组样品在小鼠主要器官中的分布情况。结果显示，与PBS组及未修饰的ReN-NV组相比，RVG-ReN-NV组在小鼠脑组织中表现出显著的荧光信号积累，而前两组在脑区域几乎未检测到明显信号（图1D）。该现象表明，经RVG肽修饰后，NV穿过血脑屏障的能力显著增强，并能够特异性富集于脑组织。尽管所有组别在肝、肺等器官中均观察到一定程度的非特异性分布，但RVG-ReN-NV在脑部的相对信号强度显著高于其他组别，证明其具有优异的脑靶向递送效率。

2.2　RVG-ReN-NV可有效改善MPTP诱导的PD小鼠黑质区域多巴胺能神经元损伤

对C57BL/6小鼠连续5 d腹腔注射20 mg/kg MPTP以进行PD小鼠急性造模，并于1、3、5、7、9 d尾静脉注射PBS、ReN-NV或者RVG-ReN-NV，15 d后进行心脏灌流，然后取脑组织进行免疫荧光实验，检测小鼠黑质区域TH和Iba1的表达情况（图2A）。MPTP连续腹腔注射5 d后，小鼠表现出明显的帕金森样运动障碍。转棒实验结果显示，MPTP组小鼠掉落潜伏期较对照组显著缩短（图2B）；爬杆实验结果显示，MPTP组小鼠总下杆时间明显延长（图2C），提示模型小鼠存在运动协调能力下降及运动迟缓，说明PD模型构建成功。免疫荧光结果显示，在小

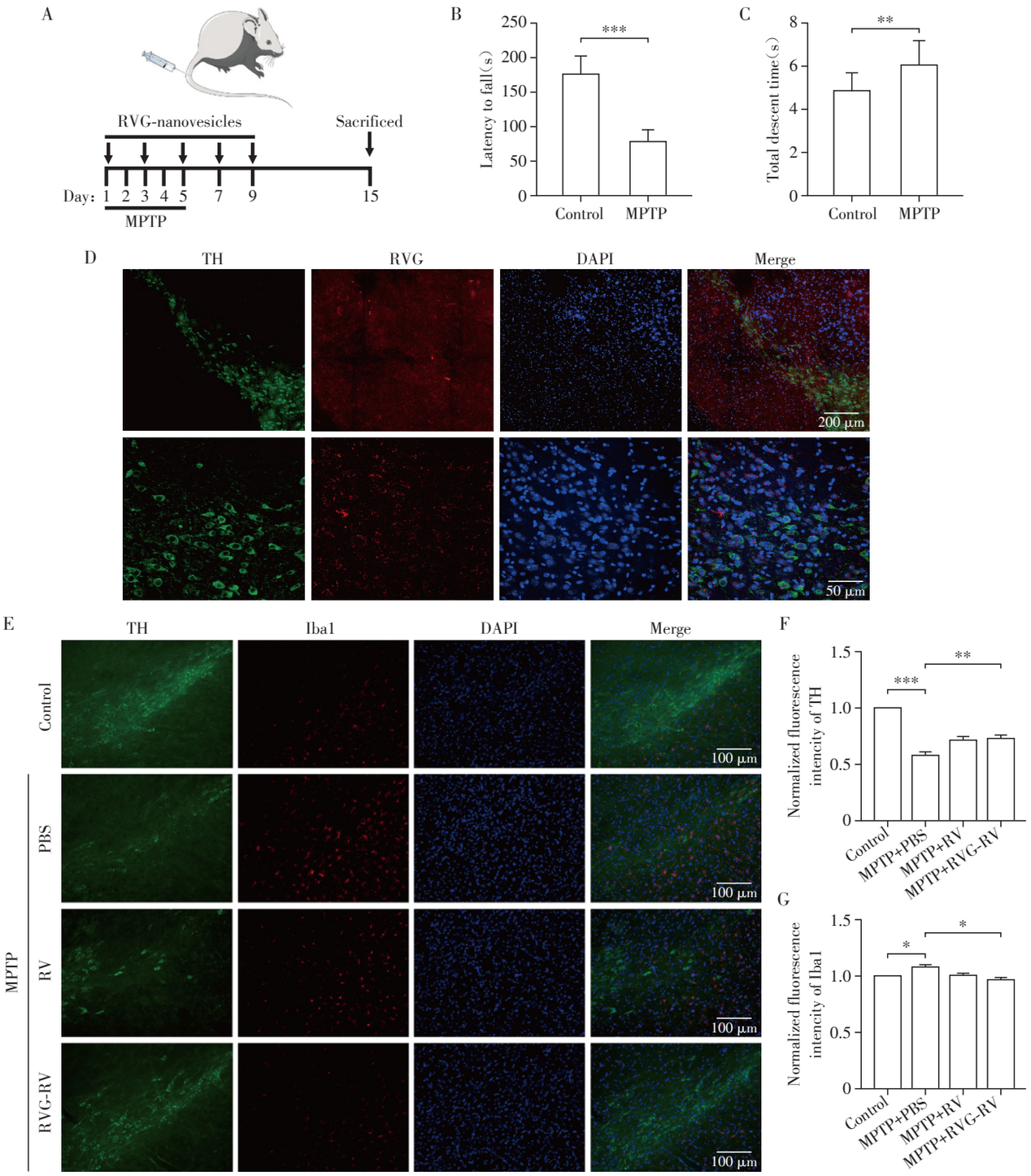


A: Representative light-scattering snapshot (top) and nanoparticle tracking analysis (NTA, bottom) images of ReN-NV, showing a primary peak size at approximately 113 nm. B: Morphological and particle size characterization of RVG-ReN-NV, showing a primary peak size at approximately 122 nm. C: Comparison of zeta potential between ReN-NV and RVG-ReN-NV. D: Evaluation of brain-targeting efficiency of ReN-NV and RVG-ReN-NV following intravenous injection in mice. Photon represents the number of photons emitted. In the figures, the ReN-NV group is denoted as RV, and the RVG-ReN-NV group is denoted as RVG-RV. $^{***}P < 0.001$.

图1　ReN-NV与RVG-ReN-NV的形态学与粒径表征

Figure 1　Morphological and particle size characterization of ReN-NV and RVG-ReN-NV

鼠黑质区域，RVG-ReN-NV（红色荧光）与TH（绿色荧光）阳性多巴胺能神经元高度共定位，表明RVG-ReN-NV可特异性地靶向神经元（图2D）。与对照组相比，MPTP处理显著降低了小鼠黑质区TH阳性神经元的数量，同时伴随着小胶质细胞标志物Iba1表达的急剧升高，表明MPTP处理组存在严重的多巴胺能神经元丢失和神经炎症（图2E）。值得注意的是，尾静脉注射ReN-NV能够部分挽救MPTP诱导的TH阳性神经元的丢失，并抑制Iba1的过度激活。更为关键的是，RVG-ReN-NV在恢复TH表达及减轻Iba1介导的神经炎症方面均表现出良好的保护作用（图2F，G）。尽管与ReN-NV相比，上述指标未达到统计学差异，但RVG-ReN-NV整体呈现出更优的改善趋势。上述结果表明，ReN-NV具有神经保护潜力，而RVG修饰在一定程度上进一步增强了其治疗效果。



A: Schematic illustration of the experimental design showing acute PD modeling *via* intraperitoneal injection of MPTP and subsequent tail vein administration of nanovesicles. B: Rotarod test showing significantly reduced latency to fall in MPTP-treated mice compared with controls (n=6). C: Pole test showing significantly prolonged total descent time in the MPTP group (n=6). D: Immunofluorescence co-localization of RVG-ReN-NV with TH-positive cells. TH immunoreactivity (green) marks tyrosine hydroxylase-positive cells, RVG-ReN-NV is visualized by red fluorescence, with nuclei counterstained by DAPI (blue) (n=3). E: Immunofluorescence staining of the substantia nigra in control, PBS, ReN-NV, or RVG-ReN-NV treated mice following MPTP administration, showing TH (green) and Iba1 (red) expression, with nuclei counterstained by DAPI (blue). Scale bar: 200 μm (n=3). F: Quantification of TH fluorescence intensity in the substantia nigra. G: Quantification of Iba1 fluorescence intensity in the substantia nigra. $^{*}P < 0.05$; $^{**}P < 0.01$ and $^{***}P < 0.001$.

图2　ReN-NV和RVG-ReN-NV能够减轻MPTP造成的黑质区域的损伤

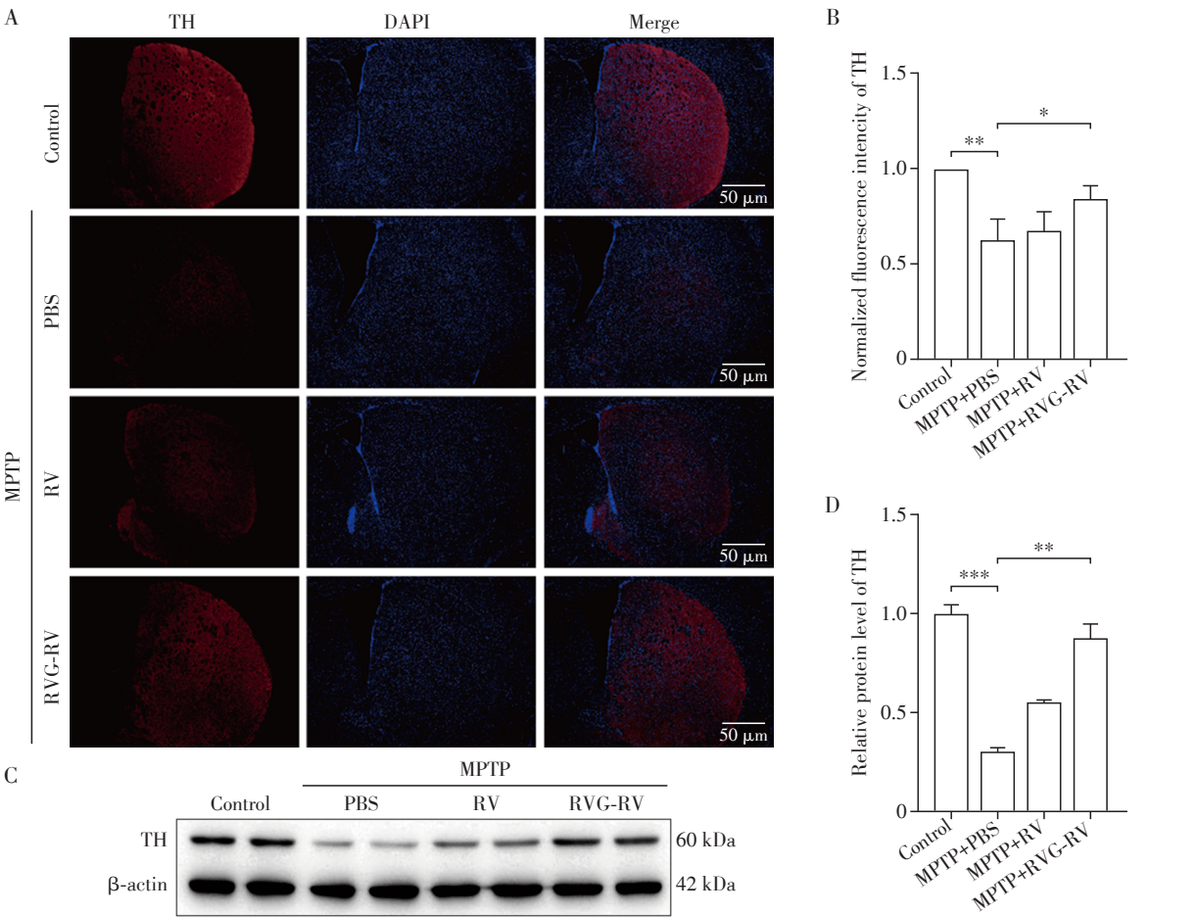
Figure 2　ReN-NV and RVG-ReN-NV can alleviate the damage in the substantia nigra region caused by MPTP

2.3　ReN-NV和RVG-ReN-NV能够减轻MPTP造成的纹状体区域损伤

鉴于黑质-纹状体通路是PD病理的核心，本研究进一步检测了纹状体区域的神经损伤情况。免疫荧光染色结果显示，MPTP引起纹状体中TH阳性神经元显著减少，ReN-NV治疗后TH阳性神经元荧光强度呈恢复趋势，但未达到统计学差异;相比之下，RVG-ReN-NV治疗可显著恢复MPTP诱导的TH阳性神经纤维丢失(图3A、B)。进一步通过Western blot检测了TH蛋白的表达水平。结果再次证实，RVG-ReN-NV可显著逆转MPTP诱导的TH蛋白表达下调，而ReN-NV仅表现出一定的恢复趋势(图3C、D)，从蛋白水平上确证了RVG-ReN-NV对多巴胺能神经元具有更好的保护能力。

2.4　ReN-NV通过递送let-7i-5p抑制MPP^+诱导的神经元凋亡从而发挥体外保护作用

为了体外探究ReN-NV的直接保护作用及其分子机制，利用MPTP的活性代谢产物MPP^+处理SH-SY5Y神经母细胞瘤细胞，以建立PD的体外细胞模型。首先，用不同浓度(0.25、0.50、1.00、2.00 mmol/L)MPP^+分别处理SH-SY5Y细胞以确定其有效损伤浓度。结果显示，1 mmol/L MPP^+处理能够引起细胞明显的形态皱缩(图4A)，并以剂量依赖的方式降低细胞活力、增加LDH释放(图4B)。基于1 mmol/L MPP^+能够显著抑制SH-SY5Y细胞增殖活力，选用1 mmol/L MPP^+进行后续的机制研究。结果显示，ReN-NV能够显著逆转由MPP^+引起的细胞活力下降(图4C)，这证实了其在体外同样具有神经保护效应。miRNA是EV发挥作用的主要生物调节因子，推测miRNA在ReN-NV减轻PD症状的过程中发挥着重要作用，结合课题组前期研究结果发现，与HEK293细胞来源的NV(HEK293-NV)相比，有32种miRNA在ReN-NV中显著上调或下调[23]。首先筛选出ReN-NV中相对于HEK293-NV显著上调的13个

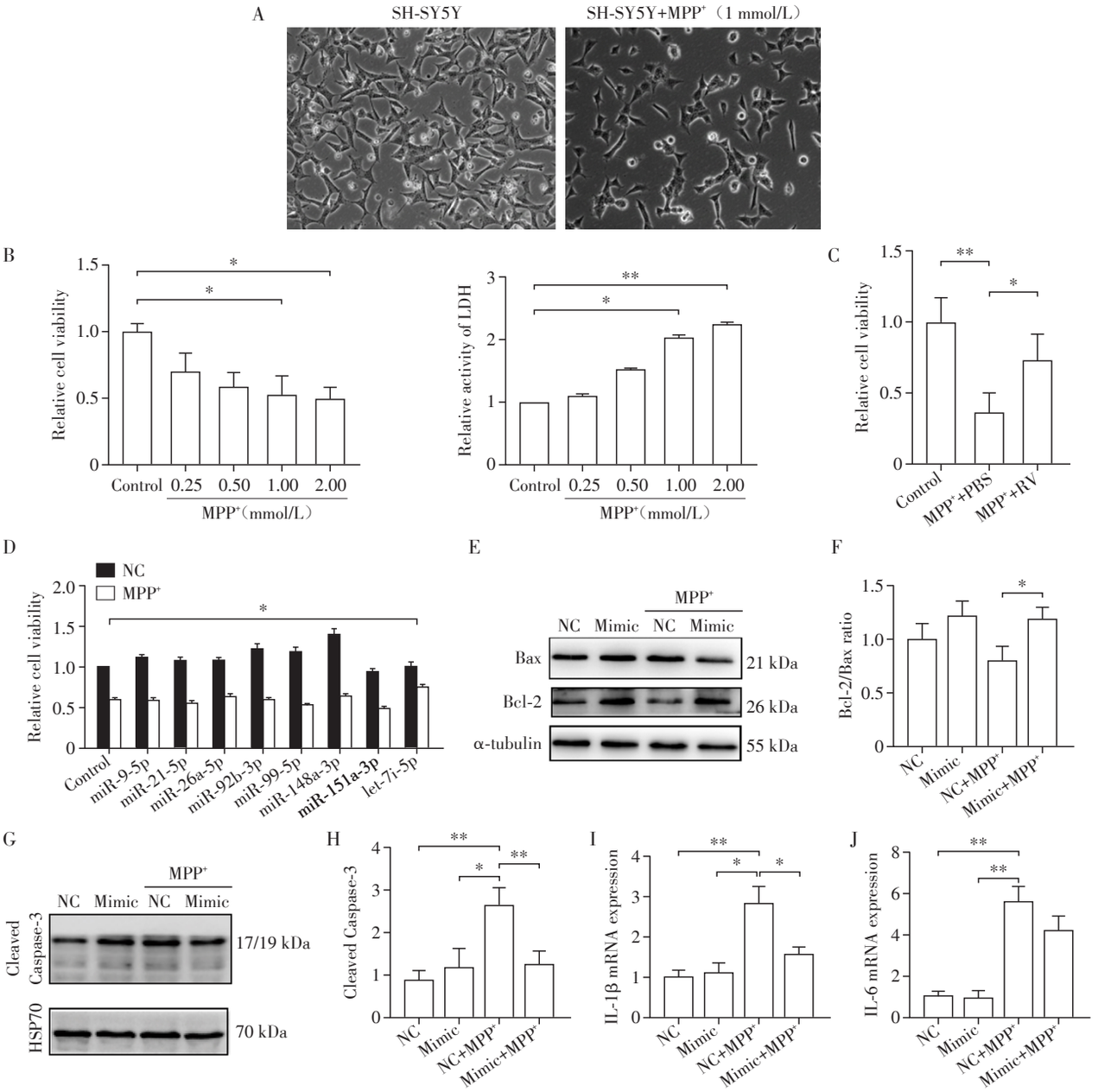


A: Immunofluorescence images of the striatal region after MPTP administration, showing TH (red) and nuclei counterstained with DAPI (blue). Scale bar: 200 μm. B: Quantitative analysis of TH-positive cells in the striatum. C, D: Western blot analysis of TH expression in the striatal region and corresponding quantification, with β-actin used as the loading control. $^*P<0.05$, $^{**}P<0.01$, and $^{***}P<0.01$ (n=3).

图3　ReN-NV和RVG-ReN-NV能够减轻MPTP造成的纹状体区域的损伤

Figure 3　ReN-NV and RVG-ReN-NV could alleviate the damage in the striatum area caused by MPTP

miRNA。这些miRNA在神经源性NV中丰度较高，并与神经发育、抗凋亡及神经保护功能相关。进一步结合文献报道和靶基因功能预测分析，从中选取了8个具有代表性的miRNA进行功能验证。通过在SH-SY5Y细胞中转染这8个miRNA的模拟物，联合MPP^+处理，细胞活力检测发现let-7i-5p mimic可以提高细胞活力，从而可能起到保护作用（图4D）。考虑到细胞凋亡在PD神经元死亡中的核心地位，继而探究了let-7i-5p是否通过调控凋亡通路来发挥作用。Western blot结果表明，在经MPP^+处理的细胞中，过表达let-7i-5p能够显著上调抗凋亡蛋白Bcl-2与促凋亡蛋白Bax的比值（图4E、F），凋亡通路下游



A: Morphological changes of SH-SY5Y cells after MPP^+ treatment（×100）. B: Relative cell viability and relative LDH activity of SH-SY5Y cells treated with different concentrations of MPP^+. C: Relative cell viability of SH-SY5Y cells co-treated with ReN-NV and 1 mmol/L MPP^+. D: Relative cell viability of SH-SY5Y cells transfected with various miRNA mimics and subsequently exposed to MPP^+（n=3）. E, F: Protein expression levels of Bax and Bcl-2 following overexpression of let-7i-5p. G, H: Protein expression levels of Cleaved Caspase-3 following overexpression of let-7i-5p. I, J: The expression of IL-1β and IL-6 mRNA in BV2 cells after transfection with let-7i-5p mimic（n=3）. $^*P < 0.05$, $^{**}P < 0.01$.

图4　ReN-NV通过递送let-7i-5p抑制MPP^+诱导的神经元凋亡，从而发挥体外保护作用

Figure 4　ReN-NV exerts neuroprotective effects *in vitro* by delivering let-7i-5p to inhibit MPP^+-induced neuronal apoptosis

指标检测结果也显示，过表达let-7i-5p能显著下调凋亡蛋白Caspase-3的表达（图4G、H）。为明确let-7i-5p对神经炎症的影响，使用体外检测let-7i-5p mimic对BV2细胞激活的影响，并检测IL-1β和IL-6 mRNA表达的变化。RT-qPCR检测结果显示，经1 mmol/L MPP^+处理，BV2细胞中IL-1β和IL-6 mRNA表达水平均明显升高；与NC+MPP^+组相比，let-7i-5p mimic转染显著抑制了MPP^+诱导的IL-1β的表达（图4I、J）。

综上所述，这些体外实验结果提示了一种潜在的作用机制：ReN-NV可将其内富含的let-7i-5p有效递送至受损神经元和炎症激活的小胶质细胞中，一方面通过调控Bcl-2/Bax比值及Caspase-3信号轴抑制细胞凋亡，另一方面显著下调IL-1β的表达水平，减轻炎症反应。上述抗凋亡与抗炎作用协同发挥，从而共同介导其神经保护效应。

3　讨　论

EV作为细胞间通讯的重要载体，是所有细胞都能够释放的一类细胞间信息交流载体，并且具有很大的应用前景[24]，然而，EV的大规模生产仍然是一个挑战。最近，通过挤压细胞制备的外泌体模拟NV已成为临床规模生产的一种替代策略[23]。PD是一种与年龄相关的神经退行性疾病，临床表现为静息性震颤、运动迟缓、僵硬等，病理表现为黑质的多巴胺能神经元逐渐丧失[25-26]。尽管近几十年来提出了多种可能的发病机制，如酶促多巴胺分解过程中的极端氧自由基释放、线粒体功能损伤以及神经炎症等，但在近几十年里，对于PD的病因仍缺乏充分的认识[26-27]。同时，大量研究也已证实miRNA的表达失调是PD的关键病理环节之一，直接参与调控α-突触核蛋白（α-synuclein）的聚集、线粒体功能障碍和神经炎症，使其成为极具吸引力的治疗靶点[28]。

本研究创新性地探索了ReN-NV在PD治疗中的潜力。体内外实验结果一致表明，ReN-NV具有显著的内源性神经保护作用，能有效缓解MPTP诱导的PD动物模型中纹状体和黑质多巴胺能神经元的损伤，或MPP^+诱导的PD细胞模型中细胞活力下降。为解决NV中枢递送效率低的问题，成功构建了表面修饰有RVG的RVG-ReN-NV。体内实验证实，RVG修饰提高了NV穿透血脑屏障且靶向神经元的能力，从而显著提升了其在PD动物模型中的治疗效果。尽管本研究通过荧光示踪初步证实了RVG-ReN-NV在脑组织中的整体富集分布情况，但其在黑质及纹状体等特定脑区的精细分布及其与TH阳性神经元的共定位关系仍有待进一步明确。采用高分辨率共聚焦显微镜结合TH阳性神经元标记进行共定位分析，是验证RVG修饰靶向性的关键手段。后续研究将采用该方法，进一步明确RVG-ReN-NV在特定脑区的分布特征及其对多巴胺能神经元的靶向能力。

在机制层面，本研究揭示了ReN-NV通过其内在富集的miRNA let-7i-5p发挥保护效应，提示let-7i-5p被递送至受损神经元和炎症激活的小胶质细胞中，一方面通过调控Bcl-2/Bax比值及Caspase-3信号轴抑制细胞凋亡，另一方面显著下调IL-1β的表达水平，减轻炎症反应，最终阻止了神经元死亡的进程。尽管本研究结果提示let-7i-5p可能参与调控Bcl-2/Bax/Caspase-3凋亡信号通路，但其与上述凋亡相关基因之间是否构成直接的靶向调控关系尚不明确，相关效应也可能通过间接机制介导。后续研究将通过荧光素酶报告基因实验或功能缺失方法对此进行深入验证。此外，本研究主要基于Bcl-2/Bax比值及Caspase-3表达水平评估细胞凋亡。上述分子均为线粒体凋亡通路中的关键调控因子，其表达变化已被广泛用于反映细胞凋亡状态，是当前凋亡研究中常用的评价方法之一[29-30]。为进一步验证ReN-NV的抗凋亡作用，后续研究将结合Annexin V-PI流式细胞术或TUNEL染色等直接检测方法进行深入分析。

干细胞来源的细胞外囊泡被公认为有前景的疗法，但其脑部靶向性差是限制其临床转化的主要瓶颈。首先，本研究采用RVG肽对ReN-NV进行修饰，成功实现了NV的主动脑靶向递送。RVG通过特异性结合神经细胞表面的烟碱型乙酰胆碱受体，使其能够高效跨越血脑屏障，这与目前多数依赖被动靶向或磁性靶向的PD治疗策略形成了鲜明差异，这一主动靶向机制极大地提高了药物在病灶区的生物利用度和治疗窗口。其次，本研究不仅论述了ReN-NV的治疗作用，更进一步精准锁定了其发挥保护作用的核心分子机制。本研究结果提示其内源性携带的let-7i-5p是ReN-NV的核心效应分子，并阐明了let-7i-5p通过Bcl-2/Bax凋亡通路抑制神经元死亡这一调节机制。这种“囊泡-miRNA-通路”的完整机制链条的揭示，使得该治疗策略建立在坚实的分子生物学基础上，超越了仅停留在细胞旁分泌效应层面的传统解释。尽管本研究取得了积极成果，但仍存在一些局限性。例如，RVG修饰后的囊泡其长期体内稳定性、代谢途径和潜在的免疫反应

仍需在大型动物模型中进行更长时间的评估。此外，本研究主要从转录水平初步评估了let-7i-5p的抗炎作用，未来研究仍需进一步检测炎症因子的蛋白表达水平（如ELISA或Western blot），并结合NF-κB等经典炎症信号通路进行深入机制分析，以更加系统地阐明其抗炎作用机制。此外，let-7i-5p可能存在多个下游靶点，对于let-7i-5p是否调控线粒体功能障碍等其他PD关键病理环节有待进一步探索。尽管本研究主要从组织病理学及分子机制层面系统评估了ReN-NV的神经保护作用，但尚未进一步开展行为学评价，未来有必要结合运动功能等行为学指标，对其在整体功能改善中的作用进行更加全面的验证。同时，需要指出的是，本研究结果基于SH-SY5Y细胞模型获得，未来仍需在原代多巴胺能神经元或诱导多能干细胞来源的神经元中进一步验证，以提高研究结果的生理相关性和外推性。本研究为基于神经干细胞来源的NV（ReN-NV）的PD治疗提供了新的思路，未来工作将围绕分子机制的深度挖掘以及递送系统的工程优化展开，例如优化ReN-NV的大规模生产、分离和纯化工艺，确保最终产品的批次间一致性、高纯度和高载药量，并建立严格的质量控制标准。此外，let-7i-5p作为miRNA，可能调控数百个下游基因。后续可以利用RNA测序、生物信息学预测等方法探讨let-7i-5p除调控凋亡和抗炎外，是否还通过靶向特定基因参与调控PD的其他关键病理学环节。除了RVG肽，也可以探索其他能特异性结合多巴胺能神经元或激活小胶质细胞的配体，并通过模块化工程将多种靶向配体或治疗分子装载到ReN-NV上，实现多功能一体化的协同治疗[31]。

综上所述，本研究首次证实了RVG修饰的ReN-NV能够作为一种安全、高效的脑靶向递送系统，通过释放其内源性let-7i-5p，有效抑制神经元凋亡和小胶质细胞的炎性反应，从而在PD模型中展现出显著的神经保护作用。这一发现为基于干细胞NV的PD治疗策略提供了实验依据，其更详尽的分子机制有待进一步深入研究。

利益冲突声明：

作者单位与期刊出版社均隶属南京医科大学，但无利益冲突。

Conflict of Interests：

The author's affiliation and the journal publisher are both affiliated with Nanjing Medical University, but there is no conflict of interest in this work.

作者贡献声明：

魏甲园和徐聖业负责实验数据获取和分析，论文初稿的撰写及修改；朱妍妍负责实验数据获取和分析；齐翠、尤卫艳和高隽负责研究设计和文稿修改。

Author's Contributions：

WEI Jiayuan and XU Shengye were responsible for data acquisition and analysis, as well as drafting and revising the manuscript. ZHU Yanyan was responsible for data acquisition and analysis. QI Cui, YOU Weiyan, and GAO Jun were responsible for study design and manuscript revision.

[参考文献]

[1] ANSARI A M, AHMED A K, MATSANGOS A E, et al. Cellular GFP toxicity and immunogenicity: potential confounders in *in vivo* cell tracking experiments [J]. Stem Cell Rev Rep, 2016, 12(5): 553-559

[2] 刘疏影. 帕金森病流行现状[J]. 中国现代神经疾病杂志，2016，16（2）：98-101
LIU S Y, CHEN B. The current epidemiological status of Parkinson's disease [J]. Chinese Journal of Modern Neurodiseases, 2016, 16(2): 98-101

[3] ZHANG Q, CHEN X T, CHEN F F, et al. Dopamine agonists versus levodopa monotherapy in early Parkinson's disease for the potential risks of motor complications: a network meta-analysis[J]. Eur J Pharmacol, 2023, 954: 175884

[4] LI A, CHA A, HUANG M, et al. A review of the recent advances in the pharmacological management of Parkinson's disease[J]. Cureus, 2025, 17(9): e93123

[5] FASANO A, DANIELE A, ALBANESE A. Treatment of motor and non-motor features of Parkinson's disease with deep brain stimulation[J]. Lancet Neurol, 2012, 11(5): 429-442

[6] YE J J, SUN X D, JIANG Q, et al. Umbilical cord blood-derived exosomes attenuate dopaminergic neuron damage of Parkinson's disease mouse model[J]. J Nanobiotechnol, 2024, 22(1): 567

[7] MATHIEU M, MARTIN-JAULAR L, LAVIEU G, et al. Specificities of secretion and uptake of exosomes and other extracellular vesicles for cell-to-cell communication[J]. Nat Cell Biol, 2019, 21(1): 9-17

[8] NASSER M I, MASOOD M, ADLAT S, et al. Mesenchymal stem cell-derived exosome microRNA as therapy for cardiac ischemic injury[J]. Biomed Pharmacother, 2021, 143: 112118

[9] GURUNG S, PEROCHEAU D, TOURAMANIDOU L, et al. The exosome journey: from biogenesis to uptake and intracellular signalling[J]. Cell Commun Signal, 2021, 19(1): 47

[10] ANEL A, GALLEGO-LLEYDA A, DE MIGUEL D, et al. Role of exosomes in the regulation of T-cell mediated immune responses and in autoimmune disease[J]. Cells, 2019, 8(2): 154

[11] LI S, LUO L H, HE Y, et al. Dental pulp stem cell-derived exosomes alleviate cerebral ischaemia-reperfusion injury through suppressing inflammatory response[J]. Cell Prolif, 2021, 54(8): e13093

[12] ZHANG J, BULLER B A, ZHANG Z G, et al. Exosomes derived from bone marrow mesenchymal stromal cells promote remyelination and reduce neuroinflammation in the demyelinating central nervous system[J]. Exp Neurol, 2022, 347: 113895

[13] VAN DOMMELEN S M, VADER P, LAKHAL S, et al. Microvesicles and exosomes: opportunities for cell-derived membrane vesicles in drug delivery[J]. J Control Release, 2012, 161(2): 635-644

[14] JANG S C, KIM O Y, YOON C M, et al. Bioinspired exosome-mimetic nanovesicles for targeted delivery of chemotherapeutics to malignant tumors[J]. ACS Nano, 2013, 7(9): 7698-7710

[15] LANGEVIN C, JAARO H, BRESSANELLI S, et al. Rabies virus glycoprotein (RVG) is a trimeric ligand for the N-terminal cysteine-rich domain of the mammalian p75 neurotrophin receptor[J]. J Biol Chem, 2002, 277(40): 37655-37662

[16] GYÖRGY B, HUNG M E, BREAKEFIELD X O, et al. Therapeutic applications of extracellular vesicles: clinical promise and open questions[J]. Annu Rev Pharmacol Toxicol, 2015, 55: 439-464

[17] ANTES T J, MIDDLETON R C, LUTHER K M, et al. Targeting extracellular vesicles to injured tissue using membrane cloaking and surface display[J]. J Nanobiotechnol, 2018, 16(1): 61

[18] ZHANG J, LI S, LI L, et al. Exosome and exosomal microRNA: trafficking, sorting, and function[J]. Genom Proteom Bioinform, 2015, 13(1): 17-24

[19] SINGH A, SEN D. MicroRNAs in Parkinson's disease[J]. Exp Brain Res, 2017, 235(8): 2359-2374

[20] PIRES F, FERREIRA Q, RODRIGUES C A V, et al. Neural stem cell differentiation by electrical stimulation using a cross-linked PEDOT substrate: Expanding the use of biocompatible conjugated conductive polymers for neural tissue engineering[J]. Biochim Biophys Acta BBA Gen Subj, 2015, 1850(6): 1158-1168

[21] BLANDINI F, ARMENTERO M T. Animal models of Parkinson's disease[J]. FEBS J, 2012, 279(7): 1156-1166

[22] WANG J, HU L, HUANG H J, et al. CAR (CARSKNK-DC) peptide modified ReNcell-derived extracellular vesicles as a novel therapeutic agent for targeted pulmonary hypertension therapy[J]. Hypertension, 2020, 76(4): 1147-1160

[23] CAO L, TIAN T, HUANG Y B, et al. Neural progenitor cell-derived nanovesicles promote hair follicle growth *via* miR-100[J]. J Nanobiotechnol, 2021, 19(1): 20

[24] GILBOA T, TER-OVANESYAN D, WANG S C, et al. Measurement of α-synuclein as protein cargo in plasma extracellular vesicles[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2024, 121(45): e2408949121

[25] YUAN Y, MA X Z, MI X Q, et al. Dopaminergic neurodegeneration in the substantia nigra is associated with olfactory dysfunction in mice models of Parkinson's disease[J]. Cell Death Discov, 2023, 9: 388

[26] SAADH M J, MUHAMMAD F A, SINGH A, et al. Micro RNAs modulating neuroinflammation in Parkinson's disease[J]. Inflammation, 2025, 48(3): 1042-1062

[27] WANG Q Q, LIU Y J, ZHOU J W. Neuroinflammation in Parkinson's disease and its potential as therapeutic target[J]. Transl Neurodegener, 2015, 4(1): 19

[28] GOH S Y, CHAO Y X, DHEEN S T, et al. Role of micro RNAs in Parkinson's disease[J]. Int J Mol Sci, 2019, 20(22): 5649

[29] CORY S, ADAMS J M. The Bcl2 family: regulators of the cellular life-or-death switch[J]. Nat Rev Cancer, 2002, 2(9): 647-656

[30] YUAN J Y, YANKNER B A. Apoptosis in the nervous system[J]. Nature, 2000, 407(6805): 802-809

[31] SUL J H, SHIN S, KIM H K, et al. Dopamine-conjugated extracellular vesicles induce autophagy in Parkinson's disease[J]. J Extracellular Vesicle, 2024, 13(12): e70018

(收稿:2026-02-13;修回:2026-06-06;录用:2026-06-08)

(本文编辑:蒋　莉)