

植物类外泌体样纳米颗粒特性、成分与功能研究进展

Research progress of plant exosome-like nanoparticles on characteristics, components and functions

陈春苹¹ 徐红艳^{1,2} 刘帅辰¹ 田雨欣² 王羽琛¹

CHEN Chunping¹ XU Hongyan^{1,2} LIU Shuaichen¹ TIAN Yuxin² WANG Yuchen¹

(1. 延边大学融合学院, 吉林 延吉 133002; 2. 延边大学农学院, 吉林 延吉 133002)

(1. College of Integration Science, Yanbian University, Yanji, Jilin 133002, China;

2. College of Agricultural, Yanbian University, Yanji, Jilin 133002, China)

摘要:类外泌体样纳米颗粒(exosome-like nanoparticles, ELNs)是细胞所分泌的纳米级小泡,双层磷脂包围的囊泡状结构,携带独特的生物活性物质(如脂质、蛋白质、miRNAs 和次级代谢物等)。植物 ELNs 因其特殊的结构和良好的生理活性,关于其展开的研究受到了广泛关注。文章综述了植物 ELNs 的分离方法、特性、组成成分及功能作用,重点阐述了多组学技术在植物 ELNs 中的应用,并对植物 ELNs 的深入研究提出了建议。

关键词:类外泌体样纳米颗粒;特性;组成成分;组学分析;功能作用

Abstract: Exosome-like nanoparticles (ELNs) are nano-sized extracellular vesicles enclosed by lipid bilayer membrane and secreted by cells; And carrying a variety of cargo, including lipids, proteins, miRNAs and secondary metabolites. Plant ELNs have received widespread attention due to their unique structure and excellent physiological activity. This review summarizes the isolation methods, characteristics, components and functions of plant ELNs, focusing on the application of multi-omics technologies in plant ELNs. In addition, some suggestions for further study of plant ELNs were put forward.

Keywords: exosome-like nanoparticles; characteristics; components; multiomics analysis; functions

植物细胞以传递性或调节性方式分泌的纳米级囊

泡,即类外泌体样纳米颗粒(exosome-like nanoparticles, ELNs),是细胞间重要的通信工具^[1]。根据生物发生机制(图 1),可分为 3 类:① 外泌体:直径为 30~150 nm,来自细胞的胞内体;② 微囊泡:直径 100~1 000 nm,由质膜向外释放(出芽)产生;③ 凋亡小体:直径 1 000~5 000 nm,由凋亡细胞释放^[2]。外泌体和微囊泡的生物发生并不是严格分开的,可以同时形成,并且两者在物理性质和组成上差异较小^[3],它们常被称为“纳米囊泡”“微囊泡”“外泌体”或“外泌体样囊泡”。国际细胞外囊泡协会(international society for extracellular vesicles, ISEV)号召对植物 ELNs 研究要标准与严谨^[4],从植物源分离的粒径在 1 000 nm 以下的纳米级囊泡,将其称为植物 ELNs。

近年来,随着动物 ELNs 在诊断、治疗、药物载体等领域的广泛应用,植物 ELNs 的功能作用也越来越受关注^[5-6]。与动物 ELNs 相比,植物 ELNs 具有来源广、可大量获取等优点。植物 ELNs 具有种间“通信”能力,可在动物疾病模型中发挥治疗作用(图 1)。一方面是由于其本身存在的生物活性物质。Deng 等^[7]从西兰花中分离出 ELNs,证明其可作用于肠道上皮细胞并维持肠道免疫稳态。另一方面,植物 ELNs 也可以用作药物载体,如装载 miRNAs、蛋白质和其他药物,低免疫原性的特点和表面特殊的成分可促进其进入器官、组织和细胞^[8-9]。Xu 等^[10]发现人参 ELNs 可将装载的 miRNAs 转移到骨髓间充质干细胞(bone mesenchymal stem cells, BMSCs),促进 BMSCs 的神经分化;与番茄 ELNs 相比,葡萄 ELNs 表现出更好的负载外源性蛋白 Hsp70 并递送到神经胶质瘤细胞的能力^[11]。因此,含有活性成分和可作为载体的植物 ELNs 具有较好的研究前景。文章拟总结近年来植

基金项目:吉林省科技发展规划资助项目(编号:20230202056NC)

作者简介:陈春苹,女,延边大学在读硕士研究生。

通信作者:徐红艳(1975—),女,延边大学教授,博士。

E-mail: xuhongyan@ybu.edu.cn

收稿日期:2023-05-11 改回日期:2023-09-09

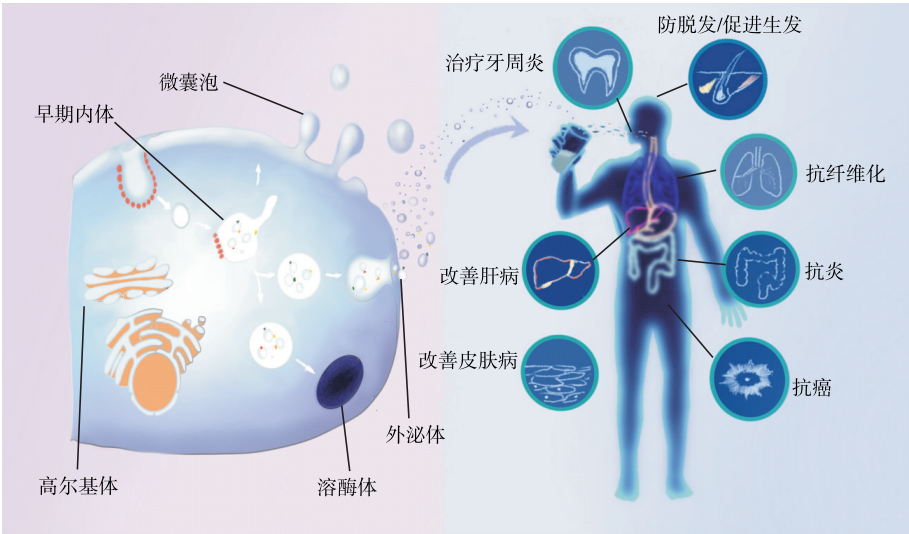


图 1 植物 ELNs 的形成及其作为生物药物在预防和治疗各种疾病中的应用

Figure 1 Forming of plant ELNs and application as biotherapeutics in prevention and treatment of various diseases

物 ELNs 的分离方法、特性、组成成分及功能, 以期 为植物 ELNs 的功能食品开发提供理论参考。

1 植物 ELNs 的分离

依据植物 ELNs 的大小、形态、表面标志物等特征, 其常见的分离方法主要有超速离心、蔗糖密度梯度离心、超滤、聚合物沉淀、免疫亲和、体积排阻色谱、微流体技术、亲和捕获和非对称流场流分馏技术等(表 1)。目前, 大多采用超高速离心法和蔗糖密度梯度离心法分离并纯化植物 ELNs^[7,10-11], 但存在 ELNs 受损、纯度低、耗时长等缺点。近年来, 新兴技术(微流体、电、声、力等)逐渐被用于 ELNs 的分离, 并表现出相对更好的分离效果, 但仍不完善^[12-13]。因此, 植物 ELNs 不同的分离方法具有不同的优点和局限性, 分离技术的选择取决于样品的性质

和后续试验需求。

2 植物 ELNs 的特性

2.1 稳定性

超高速离心法被称为 ELNs 提取的“金标准”^[14]。但反复超高速离心会造成 ELNs 损伤, 影响其生物活性^[14-15]。植物 ELNs 提取后, 悬浮于 PBS 缓冲液中, 短期保存于 4 ℃, 长期贮藏于 -80 ℃, 需避免反复冻融。4 ℃ 条件下, 百合、黄精和天麻 ELNs 随贮藏时间延长, 粒径逐渐增大, 可能发生了颗粒聚集; 但在 -80 ℃ 环境下, 粒径均未发生明显变化^[16]。化学解构剂 Triton X-100 和超声可破坏 ELNs 的磷脂膜, 使其结构不完整。Triton X-100 处理后人参 ELNs 的粒径无法测得, 且诱导巨噬细胞极化的能力被显著降低^[14]。此外, 超声处理也降低了

表 1 常见植物 ELNs 分离方法及其优缺点的比较^[12]

Table 1 Comparison of common plant ELNs isolation methods and their benefits/disadvantages

分离方法	优点	缺点
超高速离心	适用于大量样本、操作简单、不需要化学试剂	设备要求高、耗时、纯度低、超高速离心可能会损害 ELNs 结构
蔗糖密度梯度离心	高纯度、污染几率小	设备要求高、耗时、超高速离心可能会损害 ELNs 结构
超滤	步骤简单、快速	过滤的压力可能会使 ELNs 变形受损、回收率低, 部分 ELNs 可能会黏附在滤膜上, 造成损失
免疫亲和	高纯度, 高特异性、不影响 ELNs 形态完整	不适用于大量样本、回收率低
体积排阻色谱	纯度高、效率高、不易破坏 ELNs 结构	需要特殊的设备、耗时、不适于大量样品
聚合物沉淀	操作简单、回收率高	纯度低, 杂蛋白较多
微流体技术	效率高、方便携带、自动化	样品量小
亲和捕获	纯度高	不适用于大量样本
非对称流场流分馏技术	在不具有高分辨率的已知标记物的情况下分离 ELNs	存在相同 ELNs 大小的颗粒, 影响纯度

植物 ELNs 的抗氧化活性和细胞内吞能力^[16]。综上,植物 ELNs 的稳定性受其提取方法、贮藏条件和结构完整性的影响。

2.2 耐酸性

在胃肠道溶液中保持稳定性是植物 ELNs 可以口服的前提。分别在水、0.5 mol/L HCl 和 0.5 mol/L NaOH 溶液中 37 °C 孵育 30 min,相较于中性和碱性溶液,葡萄柚 ELNs 在酸性溶液中粒径分布最均匀。胃液中不仅具有低 pH,还存在多种消化酶^[17-18]。体外模拟消化评估生姜 ELNs 的消化稳定性^[19-20],其粒径在模拟胃液中增加,在模拟小肠液中则进一步增大;同时,在模拟胃液中,Zeta 电位从负变为正,而在模拟小肠液中,Zeta 电位从正向负转变;活体成像和器官成像结果也表明其主要富集在结肠组织,表明生姜 ELNs 可通过低 pH 的胃到达高 pH 的结肠中。综上,植物 ELNs 在酸溶液中粒径更稳定。

2.3 内含物差异性

植物 ELNs 含有脂质、miRNAs 和蛋白质等生物活性成分。同一品种不同大小叶片的茶叶 ELNs,液相色谱与串联质谱(liquid chromatography-tandem mass spectrometry, LC-MS/MS)结果表明脂质组成具有差异性,但都主要为磷脂酸(PA,占总脂质的 32.7%~45.7%)、磷脂酰甘油(PG,占总脂质的 19.3%~22.7%)和磷脂酰肌醇(PC,占总脂质的 13.6%~19.2%)^[21]。植物 ELNs 含有多种 miRNAs,但不同物种的 miRNAs 类型和水平与其来源有关。11 种果蔬 ELNs 样本中,共鉴定 418 种 miRNAs,每个物种分别含有 32~127 种;其中生姜 ELNs 的 miRNAs 种类最少($n=32$),大豆 ELNs 的 miRNAs 种类相对较多($n=127$)^[22]。与柠檬的蛋白质数据库相比,柠檬 ELNs 的蛋白质种类的覆盖率达到 84%^[23]。因此,植物 ELNs 的内含物具有差异性。

2.4 低免疫原性

植物 ELNs 的功能作用取决于多种因素,包括来源、组成成分、验证模型和给药途径等。在果蔬中分离得到的植物 ELNs,例如葡萄^[24]、葡萄柚^[25]、生姜^[19-20,26]、柠檬^[17]、西兰花^[7]、胡萝卜^[27]、椰子^[28-29]、苹果^[30]、人参^[31]和蓝莓^[32],不携带人畜共患病原体,具有安全可靠、副作用小、生物利用度高等优点。肠黏膜免疫系统在食物(如植物 ELNs)导致的不良反应方面起着重要作用^[33]。从葡萄柚中分离的 ELNs 可以被肠道巨噬细胞选择性吸收,从而改善葡聚糖硫酸钠(dextran sulfate sodium salt, DSS)诱导的结肠炎。柠檬 ELNs 通过胃肠道转运入血液中并送达肾脏,阻断草酸钙结石诱导的细胞内质网应激反应,将受激的胞内钙信号恢复稳态,改善肾结石^[34]。此外,植物 ELNs 可作为药物载体,相比人造纳米载体[例如基于共聚物的纳米颗粒、金属基纳米颗粒(金/银)和碳

基纳米颗粒],具有低免疫原性^[35-37]。用葡萄柚或生姜 ELNs 装载药物后不会增加炎症因子或转氨酶的表达水平,也不会引起组织病理学损伤^[38-39]。不同的给药途径也会影响 ELNs 的安全。口服植物 ELNs 不会影响试验动物的生理生化指标,也不会引起局部或全身毒性^[20,24],但其他给药方式是否具有危险性目前仍不清楚。综上,植物 ELNs 安全性仍然缺乏证据,还需要进一步研究。

2.5 生物相容性

众所周知,食物对哺乳动物细胞稳态的调节有很大的影响,特别是消化系统中的细胞。天然来源的植物 ELNs,因其可逃避免疫系统分解的生物相容性而受到关注,并且其跨物种传递“信息”的功能也得到了广泛关注。芦荟 ELNs 在人类皮肤细胞上表现出良好的细胞相容性,通过激活 Nrf2 信号通路促进伤口愈合^[40]。ELNs 能在细胞间通信,可能是自身的 miRNAs、脂质和蛋白质等生物活性物质在发挥作用。生姜 ELNs 中的脂质可通过抑制 NLRP3 炎症小体活化,治疗慢性牙周炎^[41];黄豆 ELNs 中的 miRNA-5781 可以直接靶向白细胞介素-17A,在炎症反应中起重要作用^[22];大蒜 ELNs 的表面配体(II 凝集素)与 HepG2 细胞上的 CD98 糖蛋白结合并介导 ELNs 的内化以发挥抗炎作用^[42]。植物 ELNs 不仅可跨物种与动物交流“信息”,还可以与微生物交流。拟南芥 ELNs 中 siRNA 能够跨物种运输进入疫霉菌,抑制疫霉菌的生长^[43]。综上,植物 ELNs 可跨物种传递“信息”,具有一定的生物相容性。

2.6 靶向性

植物 ELNs 的囊泡状结构使其可以装载脂溶性物质、核酸或蛋白质等,通过 ELNs 表面受体或胞吞作用与靶细胞膜融合将“货物”释放到细胞质中来发挥作用^[44]。柠檬 ELNs 可通过特异性靶向肿瘤部位,激活 TRAIL 信号通路引发细胞凋亡,抑制癌细胞增殖^[45]。西兰花 ELNs 可作用于肠道树突状细胞,靶向效应器核糖体蛋白 S6 激酶 1 调节 mTOR 信号通路,激活树突状细胞 AMPK 以释放炎症因子,维持肠道免疫稳态^[7]。Kalarikkal 等^[46]通过提取生姜以及柚子来源 ELNs 中的 miRNAs,筛选出 22 个可能针对 SARS-CoV-2 基因组的 miRNAs,发现其中 11 个 miRNAs 对 SARS-CoV-2 具有绝对的靶向性。综上,植物 ELNs 具有多组分,分别可与受体发生特异性识别,具有靶向性。

3 植物 ELNs 的成分分析

植物 ELNs 可将自身生物活性物质运输到特定部位并发挥作用(图 2)^[10,12,44]。随着测序和质谱技术的不断发展,涌现出的脂质组学、转录组学和蛋白质组学等技术能够在不同维度上反映植物 ELNs 的组成成分,多组学探究植物 ELNs 的功能逐渐成为研究热点。通过组学对

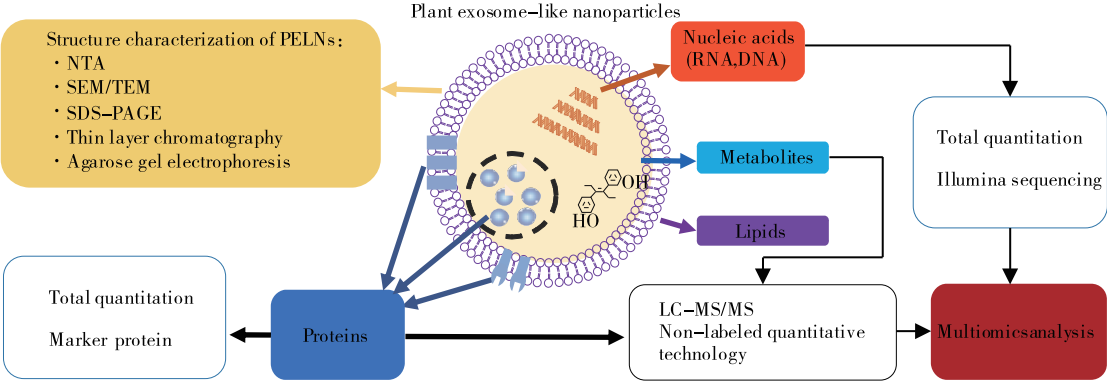


图 2 植物 ELNs 的结构组成和定性方法

Figure 2 Structure and characterization of plant exosome-like nanoparticles

植物 ELNs 在分子水平进行探究,可为植物 ELNs 的结构、功能和应用等方面提供参考。

3.1 脂质分析方法及功能

脂质主要存在于植物 ELNs 双层磷脂膜上,常用有机溶剂法提取,如 Folch 法、Bligh-Dyer 法和 Matyash 法等。脂质分析方法主要有薄层色谱法(thin-layer chromatography, TLC)和 LC-MS/MS。TLC 是最早运用在脂质组学中的色谱工具,分析步骤主要包括薄层板的制备、点样、展开、显色和分析。Bokka 等^[47]通过 TLC 证明了番茄 ELNs 中含有磷脂酰丝氨酸(PS)、PA、PC 和磷脂酰乙醇胺(PE)。但 TLC 检测范围小,灵敏度较低。目前,LC-MS/MS 在植物 ELNs 的脂质分析中应用较多(表 2)。通过三重四极杆质谱仪分析确定生姜 ELNs 富含 PC(占比 47%)^[41];电喷雾电离三重四极杆质谱仪对

大蒜 ELNs 进行脂质鉴定,发现其主要含有 PC(占比 43%)和 PE(占比 33%)^[48]。

脂质对 ELNs 有直接的保护作用。脂质主要位于 ELNs 的外层膜上,可保护内含物抵御外界环境的变化,温度、pH、模拟生理环境和超声等^[33]。体外模拟消化表明植物 ELNs 在胃液中较稳定,可被肠道微生物或者肠道上皮细胞吸收^[17]。被荧光染料标记后蓝莓和大蒜 ELNs 主要富集在结肠组织^[32,48]。植物 ELNs 中主要为磷脂类脂质,对机体也可发挥间接调控作用,如抗炎、抗癌、调节肠道菌群等功能(表 2)。生姜 ELNs 中的脂质通过作用于原代骨髓巨噬细胞(bone marrow derived macrophage, BMDM)的 NLRP3 炎症小体,发挥抗炎作用^[49];大蒜 ELNs 中的 PA 可与脑酸溶性蛋白 1(BASP1)发生作用,使更多钙调素被招募到 BASP1,导致缺乏维持

表 2 脂质组学在植物 ELNs 功能研究中的应用

Table 2 Application of lipomics in the study of plant ELNs

植物来源	脂质分析技术	脂质	功能	参考文献
茶叶	LC-MS/MS	半乳糖	促进 ELNs 在结肠炎小鼠的结肠组织中的积累	[21]
葡萄	LC-MS/MS	PA	在诱导结肠组织中的细胞增殖中起重要作用	[24]
番茄	TLC	—	—	[47]
大蒜	LC-MS/MS	PA	在 BV2 细胞中 PA(36:4)与 BASP1 结合来摄取大蒜 ELNs;磷脂酰胆碱(PC)抑制 NLRP3 炎症小体的激活	[48]
生姜	TLC; LC-MS/MS	PA, PC	在维持肠道中 ELN 积累的持续时间和数量方面发挥作用,与牙龈卟啉单胞菌表面的血红素结合蛋白 35(HBP35)结合并降低致病性;促进 ELN 从肠道迁移到肝脏;脂质抑制 NLRP3 炎症小体活化,在炎症调节中起重要作用	[41, 49]
西兰花	LC-MS/MS	—	—	[50]
人参	LC-MS/MS	神经酰胺	促进肿瘤相关巨噬细胞从 M2 向 M1 转化	[51]
柠檬	反相高效液相色谱—电喷雾电离四极杆飞行时间质谱(RP-HPLC-ESI-Q-TOF-MS)	磷脂类脂质	通过抑制 ERK1/2-NF-κB 信号通路发挥抗炎作用	[52]

c-Myc 活性所需的 c-Myc/钙调素复合物的形成,抑制脑小胶质细胞中的 c-Myc 基因的激活,从而抑制 c-GAS/STING 炎症通路相关因子表达^[48];磷脂也可影响植物 ELNs 在肠道中的存在时间和积累程度,改变肠道菌群的丰度^[53]。综上,脂质是植物 ELNs 的重要成分,对内含物有直接的保护作用和间接的功能作用。

3.2 miRNA 分析方法及功能

miRNA 是高效的基因表达调控因子,不仅在机体内执行生物学功能,还可跨界调控基因表达^[43]。植物 ELNs 中的 miRNA 相对分子质量小、含量低,磷脂双分子层保护其不被降解^[32]。微量 RNA 提取试剂盒或 ELNs-RNA 提取专用试剂盒可用来提取植物 ELNs 中的 RNAs。琼脂糖凝胶电泳对 RNAs 进行表征是比较传统的方法。通过提取蓝莓 RNAs,1%琼脂糖凝胶电泳表明其主要含有小相对分子质量 RNAs^[32]。测序技术可对 miRNA 定性和定量,并通过靶基因预测植物 ELNs 的功能作用(表 3)。

植物 ELNs 中的 miRNAs 可跨物种进入细胞。通过 ExoGlow RNA EV 试剂盒标记生姜 ELNs 的 RNA,激光共聚焦显微镜下观察到 RNA 穿过 BMDM 细胞膜被运输到细胞核附近^[52]。植物 ELNs 的 miRNAs 具有抗炎、抗癌、抗氧化以及改善神经性退行性疾病等作用(表 3)。Xiao 等^[22]对 11 种果蔬 ELNs 进行 miRNA 测序,生物信息学分析表明可靶向编码炎症相关基因(如白细胞介素-6、白细胞介素-2、白细胞介素-5 和白细胞介素-1)和癌症相关基因(如小细胞肺癌、子宫内膜癌和结直肠癌等)。因此,植物 ELNs 的 miRNA 可跨物种发挥作用,具有调节基因表达影响机体功能的作用。

3.3 蛋白质分析方法及功能

蛋白质的传统表征方法有聚丙烯酰胺凝胶电泳

(sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE)和 Western Blot。SDS-PAGE 可以鉴定出是否具有蛋白质以及蛋白质相对分子质量区间,但不能确定含有的蛋白质种类。Western Blot 可对 ELNs 的标志蛋白(CD9、CD81 等)进行鉴定,但目前植物 ELNs 的标志蛋白尚未统一。蛋白质组学可以在一定水平上探究蛋白质的特征,包括蛋白质的表达水平、翻译后的修饰、蛋白与蛋白相互作用等,定性和定量分析某些关键蛋白,来获得对蛋白质水平上的疾病发生及细胞代谢等过程的整体认识,并且结合生物信息学方法对关键蛋白功能进行挖掘,揭示植物 ELNs 的生理病理功能。常用于植物 ELNs 蛋白质组学的研究方法有 LC-MS/MS、纳米高效液相色谱—电喷雾电离(ESI)—质谱分析、鸟枪法和标记技术等(表 4)。

蛋白质浓度和囊泡数量可以用来评估 ELNs 的纯度^[54]。囊泡数量与蛋白质浓度的比值越高,表明提取到的 ELNs 纯度越好。ELNs 磷脂膜结构的稳定性也与蛋白质的含量和存在位置有关(表 4)。较高含量的膜相关蛋白会增加离子和水分子的转运,维持囊泡结构的稳态^[12]。植物 ELNs 中的蛋白质主要来源于胞质,多数为膜相关蛋白^[23,51,61-62]。西兰花 ELNs 中的水通道蛋白与囊泡的稳定性和通透性有关^[58]。通道蛋白也可影响植物 ELNs 的贮藏稳定性^[63]。此外,植物 ELNs 中的蛋白也可在生理代谢、信号传导等方面发挥作用。植物 ELNs 磷脂膜表面的蛋白配体,可促进机体识别并摄入 ELNs。大蒜 ELNs 的表面配体(II 凝集素)与 HepG2 细胞上的 CD98 糖蛋白结合并介导大蒜 ELNs 的内化以发挥抗炎作用^[42]。综上,植物 ELNs 中蛋白含量丰富,多数为膜蛋白,可维持 ELNs 结构的稳定以及作为生物活性成分发挥作用。

表 3 测序技术在植物 ELNs 功能研究中的应用

Table 3 Application of sequence technology in the study of plant ELNs

植物来源	miRNA	研究内容	参考文献
人参	—	改善神经退行性疾病	[10]
黄豆	miRNA-5781	靶向白细胞介素-17A,改善炎症	[22]
草莓	—	抗氧化	[54]
蜂蜜	miRNA-4057	抑制 NLRP3 炎症小体活化,从而改善小鼠的炎症和肝损伤	[55]
生姜	ath-miRNA-167a;aly-miRNA-159a; aly-miRNA-396a-5p、rlcv-miRNA-rlL1-28-3p	下调鼠李糖乳杆菌的 SpaC 表达,改善结肠炎;拮抗上皮细胞附着和侵袭来阻止牙龈卟啉单胞菌的定植;抑制 SARS-CoV-2Nsp12 和刺突基因的表达从而改善肺部炎症	[41,50,56]
苹果	mdm-miRNA-7121d-h	与溶质载体有机阴离子转运体家族成员 2B1(SLCO2B1)相互作用,下调 SLCO2B1 的基因表达,影响人肠道转运蛋白的功能	[57]

表 4 蛋白组学在植物 ELNs 功能研究中的应用

Table 4 Application of proteomics in the study of plant ELNs

植物来源	蛋白组学技术	研究内容	参考文献
茶叶	LC-MS/MS	改善炎症性肠病	[21]
柑橘	无标签鸟枪法	揭示了异质运输和 ELNs 种类	[23]
大蒜	LC-MS/MS	表面配体(II 凝集素)与 HepG2 细胞上的 CD98 糖蛋白结合并介导大蒜 ELNs 的内化以发挥抗炎作用	[42]
番茄	纳米高效液相色谱-ESI-质谱分析	鉴定番茄 ELNs 的纯度	[47]
人参	SDS-PAGE	参与巨噬细胞极化的转化	[52]
西兰花	HPLC-MS/MS	水通道蛋白与囊泡的稳定性和通透性有关	[58]
苦瓜	Label Free	增强 5-氟尿嘧啶对口腔鳞状细胞癌的治疗效果	[59]
桑树皮	LC-MS/MS	表面热休克蛋白家族 a(Hsp70)成员 8(HSPA8)激活 AhR 信号通路,改善结肠炎	[60]

3.4 其他活性物质

植物 ELNs 还含有糖类、酯类和酚类物质等。西兰花 ELNs 中的莱菔硫烷通过激活 AMPK,导致树突状细胞发生耐受并改善结肠炎^[7]。生姜 ELNs 中的 6-姜醇可激活核因子 Nrf2 从而改善小鼠酒精性肝损伤^[19]。苹果衍生的 ELNs 含有的类黄酮和呋喃香豆素,被证明具有抗菌作用^[64]。来自生姜的 ELNs 含有姜黄素类似物 6-姜辣素和 6-大黄素,具有抗氧化的作用^[64-65]。草莓 ELNs 富含花青素、叶酸、黄酮醇和维生素 C,对 BMSCs 没有细胞毒性,并且以剂量依赖性方式预防 BMSCs 的氧化应激^[54]。柠檬和柑橘 ELNs 具有多种黄酮类化合物,例如柠檬黄素、槲皮素、维西宁-2、柚皮苷、橙皮苷和柠檬苦素等,这可能使其发挥抗炎作用^[53]。综上,植物 ELNs 似乎具有多种组分,充分体现了多靶点、多功能的特点。

4 结论及展望

植物类外泌体样纳米颗粒(ELNs)含有脂质、miRNA、蛋白质等生物活性成分,具有一定的稳定性、耐酸性、内含物差异性、低毒性以及较好的生物相容性和靶向性,多组学分析技术也逐渐应用在植物 ELNs 的功能研究上。但相较于动物 ELNs,植物 ELNs 研究仍具有很大的发展空间。关于植物 ELNs 的研究仍存在以下问题:① 植物 ELNs 的表征主要是通过形貌观察以及组分进行确定,关于其标志性蛋白尚未统一;考虑到未来更进一步在临床上的应用,其纯度也需要作为表征因素之一。② 由于植物 ELNs 的形成通常受到植物的季节性和区域性因素的限制,并且长期的田间培养是一个耗时费力的过程,可尝试组织培养技术来提供持续、稳定和可大量分离植物 ELNs 的解决方案。③ 植物 ELNs 具有多种组分,可通过多组学联用的方法,多角度去探究功能。虽然目前植物 ELNs 存在较多未知与挑战,但其在生物相容性、治疗能力、靶向能力和细胞摄取等方面也显示出许多

优势,可通过多学科交叉融合,开发为多种常见疾病的可靠治疗剂。

参考文献

[1] KIM J S, LI S Y, ZHANG S Y, et al. Plant-derived exosome-like nanoparticles and their therapeutic activities[J]. Asian Journal of Pharmaceutical Sciences, 2022, 17(1): 53-69.

[2] QUESENBERRY P J, GOLDBERG L R, ALIOTTA J M, et al. Cellular phenotype and extracellular vesicles: Basic and clinical considerations[J]. Stem Cells & Development, 2014, 23(13): 1 429-1 436.

[3] COCUCCI E, RACCHETTI G, MELDOLESI J. Shedding microvesicles: Artefacts no more[J]. Trends in Cell Biology, 2009, 19(2): 43-51.

[4] THERY C, WITWER K, AIKAWA E, et al. Minimal information for studies of extracellular vesicles 2018 (MISEV2018): A position statement of the international society for extracellular vesicles and update of the MISEV2014 guidelines[J]. Journal of Extracellular Vesicles, 2018, 7: 1535750.

[5] CHEN Q B, LI Q, LIANG Y Q, et al. Natural exosome-like nanovesicles from edible tea flowers suppress metastatic breast cancer via ROS generation and microbiota modulation [J]. Acta Pharmaceutica Sinica B, 2022, 12(2): 907-923.

[6] ZHANG L, HE F J, GAO L N, et al. Engineering exosome-like nanovesicles derived from Asparagus cochinchinensis can inhibit the proliferation of hepatocellular carcinoma cells with better safety profile[J]. International Journal of Nanomedicine, 2021, 26(16): 1 575-1 586.

[7] DENG Z B, RONG Y, TENG Y, et al. Broccoli-derived nanoparticle inhibits mouse colitis by activating dendritic cell AMP-activated protein kinase[J]. Molecular Therapy, 2017, 25(7): 1 641-1 654.

[8] GARAEVAL L, KAMYSHINSKY R, KIL Y, et al. Delivery of functional exogenous proteins by plant-derived vesicles to human cells in vitro[J]. Scientific Reports, 2021, 11: 6 489.

- [9] HE B Y, HAMBY R, JIN H L. Plant extracellular vesicles: Trojan horses of cross-kingdom warfare[J]. *FASEB Bioadvances*, 2021, 3 (9): 657-664.
- [10] XU X H, YUAN T J, DAD A H, et al. Plant exosomes as novel nanoplateforms for microRNA transfer stimulate neural differentiation of stem cells *in vitro* and *in vivo*[J]. *Nano Letters*, 2021, 21(19): 8 151-8 159.
- [11] KILASONIYA A, GARAEVA L, SHTAM T, et al. Potential of plant exosome vesicles from grapefruit (*Citrus × paradisi*) and tomato (*Solanum lycopersicum*) juices as functional ingredients and targeted drug delivery vehicles[J]. *Antioxidants (Basel)*, 2023, 12(4): 943.
- [12] YANG D, ZHANG W, ZHANG H, et al. Progress, opportunity, and perspective on exosome isolation-efforts for efficient exosome-based theranostics[J]. *Theranostics*, 2020, 10(8): 3 684-3 707.
- [13] CHEN J, LI P, ZHANG T, et al. Review on strategies and technologies for exosome isolation and purification[J]. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 2022, 9: 811971.
- [14] CONG M H, TAN S Y, LI S M, et al. Technology insight: Plant-derived vesicles-how far from the clinical biotherapeutics and therapeutic drug carriers? [J]. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2022, 182: 114108.
- [15] LIVSHITS M A, KHOMYAKOVA E, EVTUSHENKO E G, et al. Isolation of exosomes by differential centrifugation: Theoretical analysis of a commonly used protocol[J]. *Scientific Reports*, 2015, 5: 17319.
- [16] LI S M, HE F J, QIN L X, et al. Preparation and properties of extracellular vesicle-like nanoparticles from medicinal and edible plants[J]. *Acta Pharmaceutica Sinica*, 2021, 12: 2 086-2 092.
- [17] BALDINI N, TORREGGIANI E, RONCUZZI L, et al. Exosome-like nanovesicles isolated from *Citrus limon* L. exert antioxidative effect[J]. *Current Pharmaceutical Biotechnology*, 2018, 19 (11): 877-885.
- [18] WANG B M, ZHUANG X Y, DENG Z B, et al. Targeted drug delivery to intestinal macrophages by bioactive nanovesicles released from grape fruit[J]. *Molecular Therapy*, 2014, 22: 522-534.
- [19] ZHUANG X Y, DENG Z B, MU J Y, et al. Ginger-derived nanoparticles protect against alcohol-induced liver damage [J]. *Journal of Extracellular Vesicles*, 2015, 4: 28713.
- [20] ZHANG M Z, VIENNOIS E, PRASAD M, et al. Edible ginger-derived nanoparticles: A novel therapeutic approach for the prevention and treatment of inflammatory bowel disease and colitis-associated cancer[J]. *Biomaterials*, 2016, 101: 321-340.
- [21] ZU M H, XIE D C, BRANDON S B, et al. " Green " nanotherapeutics from tea leaves for orally targeted prevention and alleviation of colon diseases[J]. *Biomaterials*, 2021, 279: 121178.
- [22] XIAO J, FENG S Y, WANG X, et al. Identification of exosome-like nanoparticle-derived microRNAs from 11 edible fruits and vegetables[J]. *Peer J*, 2018, 6: e5186.
- [23] STANLY C, MOUBARAK M, FIUME I, et al. Membrane transporters in citrus clementina fruit juice-derived nanovesicles [J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2019, 20(24): e6205.
- [24] JU S W, MU J Y, DOCKLAND T, et al. Grape exosome-like nanoparticles induce intestinal stem cells and protect mice from DSS-induced colitis[J]. *Molecular Therapy*, 2013, 21(7): 1 345-1 357.
- [25] WANG Q L, REN Y, MU J Y, et al. Grape fruit-derived nanovectors use an activated leukocyte trafficking pathway to deliver therapeutic agents to inflammatory tumor sites[J]. *Cancer Research*, 2015, 75(12): 2 520-2 529.
- [26] BRAHMBHATT M, GUNDALA S R, ASIF G, et al. Ginger phytochemicals exhibit synergy to inhibit prostate cancer cell proliferation[J]. *Nutrition and Cancer*, 2013, 65(2): 263-272.
- [27] MU J Y, ZHUANG X Y, WANG Q L, et al. Interspecies communication between plant and mouse gut host cells through edible plant derived exosome-like nanoparticles [J]. *Molecular Nutrition & Food Research*, 2014, 58(7): 1 561-1 573.
- [28] ZHAO Z H, YU S R, LI M, et al. Isolation of exosome-like nanoparticles and analysis of microRNAs derived from coconut water based on small RNA high-throughput sequencing[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2018, 66 (11): 2 749-2 757.
- [29] YU S R, ZHAO Z H, XU X Y, et al. Characterization of three different types of extracellular vesicles and their impact on bacterial growth[J]. *Food Chemistry*, 2019, 272: 372-378.
- [30] FUJITA D, ARAI T, KOMORI H, et al. Apple-derived nanoparticles modulate expression of *Organic-anion-transporting polypeptide (OATP) 2B1* in caco-2 cells [J]. *Molecular Pharmaceutics*, 2018, 15 (12): 5 772-5 780.
- [31] LU S Y, YANG S, REN L M, et al. Panax ginseng exosomes promote HaCaT cell proliferation and wound healing[J]. *Chinese Journal of Biochemistry and Molecular Biology*, 2021, 37(11): 1 510-1 519.
- [32] ZHAO W J, BIAN Y P, WANG Q H, et al. Blueberry-derived exosomes-like nanoparticles ameliorate nonalcoholic fatty liver disease by attenuating mitochondrial oxidative stress [J]. *Acta Pharmacologica Sinica*, 2022, 43: 645-658.
- [33] WANG Y, WEI Y S, LIAO H, et al. Plant exosome-like nanoparticles as biological shuttles for transdermal drug delivery [J]. *Bioengineering (Basel)*, 2023, 10(1): 104.
- [34] ZHANG L, LI S M, CONG M H, et al. Lemon-derived extracellular vesicle-like nanoparticles block the progression of kidney stones by antagonizing endoplasmic reticulum stress in renal tubular cells[J]. *Nano Letters*, 2023, 23(4): 1 555-1 563.
- [35] WOLFRAM J, ZHU M T, YANG Y, et al. Safety of nanoparticles in medicine[J]. *Current Drug Targets*, 2015, 16(14): 1 671-1 681.
- [36] NELEMANS L C, GUREVICH L. Drug delivery with polymeric nanocarriers-cellular uptake mechanisms [J]. *Materials*, 2020, 13 (2): 366.
- [37] ZHOU M X, HUANG H, WANG D Q, et al. Light-triggered PEGylation/de PEGylation of the nanocarriers for enhanced tumor

- penetration[J]. *Nano Letters*, 2019, 19(6): 3 671-3 675.
- [38] WANG Q L, ZHUANG X Y, MU J Y, et al. Delivery of therapeutic agents by nanoparticles made of grape fruit-derived lipids [J]. *Nature Communications*, 2013, 4: 1 867.
- [39] ZHANG M Z, XIAO B, WANG H, et al. Edible ginger-derived nano-lipids loaded with doxorubicin as a novel drug-delivery approach for colon cancer therapy[J]. *Molecular Therapy*, 2016, 24: 1 783-1 796.
- [40] KIM M K, CHOI Y C, CHO S H, et al. The antioxidant effect of small extracellular vesicles derived from *Aloe vera* peels for wound healing[J]. *Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, 2021, 18(4): 561-571.
- [41] SUNDARAM K, MILLER D P, KUMAR A, et al. Plant-derived exosomal nanoparticles inhibit pathogenicity of *Porphyromonas gingivalis*[J]. *iScience*, 2019, 22(21): 308-327.
- [42] SONG H L, CANUP B S B, NGO V L, et al. Internalization of garlic-derived nanovesicles on liver cells is triggered by interaction with CD98[J]. *ACS Omega*, 2020, 5: 23 118-23 128.
- [43] CAI Q, QIAO L L, WANG M, et al. plants send small RNAs in extracellular vesicles to fungal pathogen to silence virulence genes [J]. *Science*, 2018, 360: 1 126-1 129.
- [44] GUDBERGSSON J M, JÖNSSON K, SIMONSEN J B, et al. Systematic review of targeted extracellular vesicles for drug delivery-Considerations on methodological and biological heterogeneity[J]. *Journal of Controlled Release*, 2019, 28(306): 108-120.
- [45] RAIMONDO S, NASELLI F, FONTANA S, et al. Citrus limon-derived nanovesicles inhibit cancer cell proliferation and suppress CML xenograft growth by inducing TRAIL-mediated cell death[J]. *Oncotarget*, 2015, 6(23): 19 514-19 527.
- [46] KALARIKKAL S P, SUNDARAM G M. Edible plant-derived exosomal microRNAs: Exploiting a cross-kingdom regulatory mechanism for targeting SARS-CoV-2[J]. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 2021, 414: 115425.
- [47] BOKKA R, RAMOS A P, FIUME I, et al. Biomanufacturing of tomato-derived nanovesicles[J]. *Foods*, 2020, 9: 1 852.
- [48] SUNDARAM K, MU J, KUMAR A, et al. Garlic exosome-like nanoparticles reverse high-fat diet induced obesity via the gut/brain axis[J]. *Theranostics*, 2022, 12(3): 1 220-1 246.
- [49] CHEN X Y, ZHOU Y, YU J J. Exosome-like nanoparticles from ginger rhizomes inhibited NLRP3 inflammasome activation [J]. *Molecular Pharmaceutics*, 2019, 16: 2 690-2 699.
- [50] LI C M, SONG Q, YIN X L, et al. Preparation, characterization, and in vitro anticancer activity evaluation of broccoli-derived extracellular vesicle-coated astaxanthin nanoparticles [J]. *Molecules*, 2022, 27: 3 955.
- [51] CAO M, YAN H J, HAN X, et al. Ginseng-derived nanoparticles alter macrophage polarization to inhibit melanoma growth [J]. *Journal of Immunotherapy of Cancer*, 2019, 7(1): 326.
- [52] RAIMONDO S, URZÌ O, MERAVIGLIA S, et al. Anti-inflammatory properties of lemon-derived extracellular vesicles are achieved through the inhibition of ERK/NF- κ B signalling pathways[J]. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 2022, 26(15): 4 195-4 209.
- [53] TENG Y, REN Y, SAYED M, et al. Plant-derived exosomal microRNAs shape the gut microbiota[J]. *Cell Host Microbe*, 2018, 24: 637-652.
- [54] PERUT F, RONCUZZI L, AVNET S, et al. Strawberry-derived exosome-like nanoparticles prevent oxidative stress in human mesenchymal stromal cells[J]. *Biomolecules*, 2021, 11(1): 87.
- [55] CHEN X Y, LIU B L, LI X Z, et al. Identification of anti-inflammatory vesicle-like nanoparticles in honey [J]. *Journal of Extracellular Vesicles*, 2021, 10(4): e12069.
- [56] TENG Y, XU F Y, ZHANG X C, et al. Plant-derived exosomal microRNAs inhibit lung inflammation induced by exosomes SARS-CoV-2 Nsp12[J]. *Molecular Therapy*, 2021, 29: 2 424-2 440.
- [57] KOMORI H, FUJITA D, SHIRASAKI Y, et al. MicroRNAs in apple-derived nanoparticles modulate intestinal expression of organic anion-transporting peptide 2B1/SLCO2B1 in caco-2 Cells [J]. *Drug Metabolism and Disposition*, 2021, 49(9): 803-809.
- [58] MARTÍNEZ-BALLESTA M D C, GARCÍA-GÓMEZ P, YEPES-MOLINA L, et al. Plasma membrane aquaporins mediates vesicle stability in broccoli[J]. *PLoS One*, 2018, 13(2): e0192422.
- [59] YANG M, LUO Q Q, CHEN X, et al. Bitter melon derived extracellular vesicles enhance the therapeutic effects and reduce the drug resistance of 5-fluorouracil on oral squamous cell carcinoma[J]. *Journal of Nanobiotechnology*, 2021, 19: 259.
- [60] SRIWASTVA M K, DENG Z B, WANG B, et al. Exosome-like nanoparticles from mulberry bark prevent DSS-induced colitis via the AhR/COPS8 pathway[J]. *EMBO Reports*, 2022, 23(3): e53365.
- [61] PÉREZ-BERMÚDEZ P, BLESÁ J, SORIANO J M, et al. Extracellular vesicles in food: Experimental evidence of their secretion in grape fruits [J]. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2017, 98: 40-50.
- [62] WOITH E, GUERRIERO G, HAUSMAN J F, et al. Plant extracellular vesicles and nanovesicles: Focus on secondary metabolites, proteins and lipids with perspectives on their potential and sources[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2021, 22: 3 719.
- [63] CHALBI N, MARTÍNEZ-BALLESTA M C, YOUSSEF N B, et al. Intrinsic stability of brassicaceae plasma membrane in relation to changes in proteins and lipids as a response to salinity[J]. *Journal of Plant Physiology*, 2015, 175: 148-156.
- [64] DELIMA R M T, DOS R A C, DE MENEZES A P M, et al. Protective and therapeutic potential of ginger (*Zingiber officinale*) extract and [6]-gingerol in cancer: A comprehensive review[J]. *Phytotherapy Research: PTR*, 2018, 32(10): 1 885-1 907.
- [65] BISCHOFF-KONT I, FURST R. Benefits of ginger and its constituent 6-shogaol in inhibiting inflammatory processes [J]. *Pharmaceuticals*, 2021, 14: 571.