

植物微小RNA跨界调控机制及其应用研究进展

田雪梅^{1,2}, 张君², 荣华², 张莉华², 马晓慧², 孙立^{1*}

(1. 中国药科大学, 江苏省新药筛选重点实验室, 江苏南京 210009; 2. 天士力医药集团股份有限公司, 创新中药关键技术国家重点实验室, 天津 300410)

摘要: 微小RNA (microRNA, miRNA) 是在多种真核细胞及病毒中发现的一类参与基因表达调控的非编码单链RNA。近期研究表明, 植物来源的miRNA可以稳定地存在于动物的血液与组织器官中, 并参与调控多种靶蛋白的表达而发挥作用。本文拟从植物miRNA跨界调控的研究现状出发, 梳理植物miRNA发挥跨界调控功能的机制, 并对其在中药miRNA活性成分的挖掘、小核酸药物开发、以植物为载体的药物开发等应用前景进行综述, 有利于加深对植物miRNA跨界调控的认识以及对药用植物作用机制和生物学功能的理解, 为开发预防或治疗人类疾病的新方法提供思路。

关键词: miRNA; 跨界调控; 基因沉默; 植物; 中药; 药物载体

中图分类号: R966 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2020)06-1137-10

Advances in mechanism and application for plant microRNA in cross-kingdom regulation

TIAN Xue-mei^{1,2}, ZHANG Jun², RONG Hua², ZHANG Li-hua², MA Xiao-hui², SUN Li^{1*}

(1. Jiangsu Key Laboratory of Drug Screening, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009, China; 2. State Key Laboratory of Core Technology in Innovative Chinese Medicine, Tasly Holding Group Co., Ltd., Tianjin 300410, China)

Abstract: MicroRNAs (miRNAs) are a class of non-coding single-stranded RNAs involved in the regulation of gene expression found in a wide variety of eukaryotic cells and viruses. Recent studies have shown that some plant-derived miRNAs, which can stably exist in blood, tissues, and organs of animals, play a role in regulating the expression of different target proteins. In this review, we intend to sort out the mechanism of plant miRNA regulation based on the current research, and discuss its application prospects in the mining of miRNA active components of traditional Chinese medicine, small nucleic acid drug development, and drug development using plants as carriers. This can be beneficial to deepen the understanding of plant miRNA regulation, as well as the pharmacological mechanism and biological function of medicinal plants, thus providing new ideas for the prevention or treatment therapies towards human diseases.

Key words: miRNA; cross-kingdom regulation; gene silence; plant; traditional Chinese medicine; drug carrier

微小RNA (microRNA, miRNA) 是一类长度约为19~25个核苷酸 (nucleotide, nt) 的短RNA分子, 是由细胞内源基因产生的发卡结构转录本加工而来^[1,2], 具有高度的保守性、时序特异性和组织特异性。生物信

息学研究表明, miRNA介导哺乳动物中约30%的蛋白质编码基因的转录后沉默, 其可通过对靶基因的切割或者抑制转录后翻译来发挥转录后水平的负调控作用^[3,4]。miRNA自发现以来就被证明在动植物等内源性细胞的生长发育、分化凋亡、代谢、环境胁迫、免疫应答、母婴调控等生理环节中发挥重要作用。此外, miRNA还参与癌症、心血管等一些疾病病理的发生、

收稿日期: 2019-12-16; 修回日期: 2020-03-08.

基金项目: 国家科技重大专项资助项目 (2017ZX09301005).

*通讯作者 Tel: 86-25-83271057, E-mail: sunli@cpu.edu.cn

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2019-1024

发展过程^[5-9]。越来越多的研究表明, miRNA 不仅可以靶向生物体内源性基因, 还可以跨界调控其他种属基因的表达。已有研究发现, 在动物血液循环中存在一些植物来源的 miRNA, 这些植物 miRNA 被证明能够发挥一定的生理调控功能^[10]。目前研究的植物中药活性成分主要是生物碱、甙类、挥发油、氨基酸、多糖等次级代谢物, 上述现象的发现无疑为寻找中药活性成分和解释中药作用机制提供了新的思路。本文通过梳理植物 miRNA 跨界调控的相关文献, 详细总结了植物 miRNA 跨界调控的研究现状及可能的作用机制, 并重点对植物 miRNA 在中药活性成分发掘、小核酸药物开发、以植物为载体的药物开发等的应用前景进行了探讨, 以期对植物 miRNA 跨界调控有更多的了解, 为植物 miRNA 跨界调控的研究方向提供思路。

1 miRNA 跨界调控研究的历程

1.1 跨界调控现象的发现

自然界的生物体之间存在紧密的联系, 跨物种间的细胞信号交流越来越受到研究者的关注。有研究表明, 生物体内部或生物体间的交流依赖激素或类激素物质^[11], 而近年来研究发现 miRNA 能够作为物种间的信号传递分子在转录后基因表达过程中起着重要的调控作用 (图 1)。在 2005 年发现人细胞中的 miR-32 和 miR-122 均能有效抑制细胞中逆转录病毒灵长类泡沫病毒-1 (primate foamy virus-1) 的复制, 进而发挥跨界调控作用^[12]; 宿主细胞通过上调 miR-199a-3p 和 miR-210 调控乙型肝炎病毒的复制^[13]; 某些真菌病原体葡萄菌孢的小 RNA (*B. cinerea* small RNAs, Bc-sRNA), 例如 Bc-siR3.1 可以沉默植物拟南芥和番茄的相关基因, 从而抑制其宿主的免疫反应^[14]。在 2011 年, Zhang 等^[15]报道了一项重大发现, 植物来源的 miRNA168a 能够穿过小鼠的消化系统进入血液循环, 随后到达体内多个组织器官, 调节小鼠的脂质代谢。通过多项实验研究表明, miR168a 可靶向肝脏中低密度脂蛋白受体衔接蛋白-1 (low-density lipoprotein receptor adapter protein 1, LDLRAP-1), 并抑制该蛋白的表达, 进而降低低密度脂蛋白 (low-density lipoprotein, LDL) 的血浆清除, 该研究结果首次揭示了植物来源的 miRNA168a 可以跨物种调控哺乳动物的基因表达。一经报道便引起众多争议和关注^[16], 掀起了广泛的研究热潮。至此, 植物来源 miRNA 跨界调控动物基因的研究拉开了序幕。

1.2 植物 miRNA 调控哺乳动物功能的研究现状

2012 年, Wang 等^[17]使用二代测序技术在人血浆中检测到大量来自各种外源物种 (包括植物) 的 miRNA。从血浆样品中鉴定出的最丰富的植物来源 miRNA 序

列来自玉米和水稻, 除普通谷物外, 在血浆样品中还观察到了包括大豆、番茄、葡萄等植物中的 miRNA。该研究还表明, 外源 miRNA 可能与血浆中的蛋白质和脂质形成复合物以保护其免受破坏并可能影响细胞功能, 进一步支持了 Zhang 等^[15]的研究结果。植物 miRNA 被证实可以到达动物体内消化道及血液循环, 进而对机体发挥一定的调控作用, 目前研究发现外源植物 miRNA 除了对机体有调节脂质代谢的功能外还有以下几个方面作用。

1.2.1 抗病毒作用 中药金银花具有清热解毒杀菌的作用, Yang 等^[18,19]在 2015 年的 2 项研究显示, 金银花中的 miR2911 可以在小鼠的血清和尿液中被检测到, 并且 miR2911 的分子水平与饮食摄入水平相关。Zhou 等^[20]在煎煮后的金银花药液中也发现了稳定存在的 miR2911, 其在动物体内可直接靶向多种亚型流感病毒 (H1N1、H5N1 和 H7N9), 抑制病毒的复制, 防止病毒感染引起的小鼠体重减轻, 并显著降低由 H5N1 病毒感染引起的小鼠死亡率。

1.2.2 抗肿瘤作用 体外实验研究表明, 植物来源 miR167e-5p 可以通过靶向 β -catenin 蛋白抑制肠癌细胞的增殖^[21]。有研究表明, 在西方人群的血清中检测到植物 miR159 的存在, 并且进一步研究发现植物来源的 miR159 能显著抑制乳腺癌细胞的增殖^[22]。miR159 通过靶向编码 Wnt 信号通路的转录因子 7 (transcription factor 7) 基因, 下调原癌基因 *MYC* 的表达, 从而发挥抑制肿瘤的作用。更为有趣的是, 研究人员在多种植物如西兰花中发现了高表达的 miR159, 而西兰花又是被广泛接受的抗癌食物, 这项研究为西兰花的抗癌机制提供了一定的理论依据, 也为植物 miRNA 跨界调控基因表达提供了有力的支持。

1.2.3 调节免疫作用 Cavalieri 等^[23]发现植物 miRNA 可以改变树突状细胞对炎症因子的反应能力, 抑制炎症因子表达和细胞活化, 进而抑制 T 细胞增殖。这种免疫调节效应可能与植物 miRNA 结合树突状细胞 Toll 样受体 3 (Toll-like receptor 3, TLR3) 导致 TRIF (TIR-domain-containing adapter-inducing IFN- β signaling) 信号传导受损有关。另外该研究显示, 植物 miRNA 具有改善实验性变态反应性脊髓炎模型的作用, 提示植物 miRNA 具有防慢性炎症相关疾病的潜力。Xiang 等^[24]发现甘草的 miRNA 对人免疫细胞的基因表达具有明显调节作用, 能够显著抑制 T 细胞分化以及炎症和凋亡相关基因的表达, 为进一步更全面地了解中药甘草的作用机制带来了新思路。Shen 等^[25]证实了经鼻滴入转染方法可使哮喘小鼠的脾脏、外周血和肺组织均高表达植物来源的 miR396, 体内转染中药黄芪来源

miR396可抑制哮喘小鼠2型辅助型T细胞(T helper 2 cell, Th2)类细胞因子特异性转录因子GATA-3(GATA binding protein 3)表达,表明中药黄芪来源的miR396可作为一种潜在的哮喘治疗策略加以深入研究。

1.2.4 保护心血管作用 最新的研究报告证明了来自蔬菜的miR156在心血管疾病中的作用,体外实验表明植物miR156可靶向连接黏合分子-A(junction adhesion molecule-A, JAM-A),该分子在动脉粥样硬化患者中出现上调,miR156通过抑制JAM-A的表达,减少了炎症细胞因子诱导的单核细胞对血管内皮细胞的黏附,从而保护血管并改善动脉粥样硬化的发展^[26]。该研究揭示了绿色蔬菜通过其植物miRNA保护人体血管的作用,提供了一种新的血管保护分子机制,也为饮食预防干预心血管疾病增添了新的思路。

综上所述,植物miRNA在调节脂质代谢、抗病毒、抗肿瘤、免疫调节、保护心血管等方面发挥了跨界调控功能。植物miRNA的跨界调控研究成果不仅为miRNA的应用提供了新的途径,同时也为阐明药用植物中药药效物质基础和中药作用机制提供新的研究方向^[27]。在对10种中药的研究中发现,每种中药都有几十万种包括miRNA在内的小RNA,其中数百上千的小RNA可以入血入肺,这些研究证实了中药小RNA进入动物体内的普遍性^[28],也提示还有更多的植物miRNA的功能值得进一步探索。

2 植物miRNA的稳定性及其跨界吸收作用机制

植物miRNA对异源基因具有一定的生物学活性,但是仍有许多机制尚未阐明,如新鲜植物在被制备成

汤剂或者熟食过程中是如何保证其miRNA的完整性和稳定性、植物miRNA如何穿过消化道并在循环系统中避免被降解、靶组织或者靶细胞对植物miRNA的吸收及作用机制是如何进行的等问题。

2.1 植物miRNA的稳定性

2.1.1 植物miRNA在蒸煮、烹饪中的稳定性 研究表明,烹饪后的西兰花中仍然存在丰度较高的miR159^[23]。在对熟玉米饲料中玉米miRNA浓度的评估中,发现其浓度虽然与新鲜玉米的miRNA含量相比降低至1/30,但是在不同的玉米饲料中甚至在恶劣的膨化处理之后依然能够检测到18种玉米的miRNA,证明玉米miRNA在一定程度上对恶劣的蒸煮条件具有一定的抗性^[29];Wang等^[30]通过Illumina高通量测序和实时定量PCR(quantitative real time-polymerase chain reaction, qRT-PCR)方法验证了在高温煮沸的新鲜人参汤中miRNA仍可稳定存在,从水煎液中鉴定出属于71个miRNA家族的43种miRNA。Xie等^[31]通过制备中药槲寄生的提取物,证实了中药提取过程中植物来源miRNA的稳定性,表明哺乳动物中可以存在功能完整的药用植物miRNA。中药原材料经加工、销售、储存、配制、煎煮、直至患者服用具有相当复杂漫长的过程,与一般植物miRNA分析研究的目的和方法存在很大差异。Shen等^[32]首次揭示了经热力学处理后黄芪饮片的miRNA谱,并分别确定了1个保守的和9个新发现的miRNA,进一步生物信息学分析表明3'端种子区对热力学高度稳定。

以上研究表明,与在加工过程中丧失完整性的

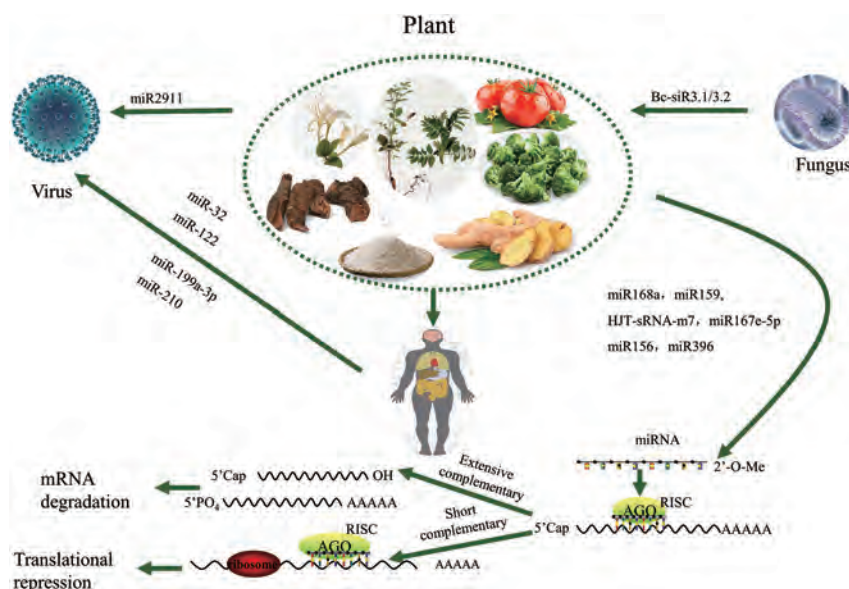


Figure 1 Examples of microRNA (miRNA) cross-kingdom regulation and mechanism of action. Bc: *B. cinerea*; RISC: RNA-induced silencing complex; AGO: Argonaute, the core component of RISC; HJT: Hong Jing Tian, a kind of traditional Chinese medicine; AAAAA: Poly-adenosine tail; The arrows indicate the direction of the small RNA transfer

mRNA不同,植物miRNA在浸泡和煮沸过程中都相对处于比较稳定的状态。

2.1.2 植物miRNA在消化道和循环系统中的稳定性
植物miRNA本身的结构特异性使得其可能在动物体内稳定存在。前期实验模拟发现,植物miRNA在pH 2.0的极端胃酸环境中的降解速度与动物miRNA相比显著减慢^[15]。Philip等^[33]在通过模拟人类消化系统来研究大豆和玉米miRNA的稳定性时发现,在存储、加工、烹饪和早期消化(75 min)过程中,大豆、玉米中的某些植物miRNA仍可稳定存在。中药金银花在煮沸30 min后,多数miRNA降解,而miR2911因其具有较高GC含量的特定序列,使得其在该煎剂中高度稳定并且能够对RNase处理具有抗性^[20];植物自身天然成分(蛋白质、脂质、多糖和多酚等)也可以促进植物miRNA在循环系统中的稳定性^[19,34]。另外,植物来源miRNA在结构上具有不同于动物miRNA的独特性,前者3'端的2'-O-甲基化可以保护它们免受核酸外切酶的降解和尿苷酸化而增强其稳定性^[35,36]。

除了植物miRNA自身结构稳定性之外,众多研究表明,外泌体、微囊泡等载体也可保护miRNA不被核酸酶降解,并可介导其进入动物体内。Köberle等^[37]在从血清中分级提取囊泡包裹的miRNA和非囊泡包裹的miRNA后,给予RNase A或RNase抑制剂孵育后,利用qRT-PCR检测miRNA的表达情况,结果发现囊泡包裹的miRNA对RNase A处理的抵抗力优于无囊泡包裹的miRNA。在一项最新研究中^[38],发现并分离鉴定出中药汤剂中含有外泌体样纳米粒(exosome-like nanoparticles, ELNs),并将其命名为“汤剂体”,其包含植物脂质、miRNA、化合物分子和蛋白质组分,体内外细胞实验发现红景天和蒲公英“汤剂体”分别显示出良好的抗纤维化疗效和抗急性肺损伤作用,研究表明这种结构可以使miRNA在进入细胞和机体的过程中尽可能免受核酸酶的降解,增加中药有效物质吸收入血,提高中药疗效。“汤剂体”结构的发现为其含有的植物miRNA在跨物种递送过程中保持稳定性的具体作用机制提供了合理的解释。

2.2 植物miRNA的转运吸收机制

近几年,细胞内源性miRNA的载体已经被鉴定,根据来源、大小和形式主要分为外泌体、微囊泡和凋亡小体^[39,40],在植物如葡萄、椰子、生姜等中已鉴定出携带蛋白质、脂质和miRNA的ELNs^[41-43],甚至是中药汤剂中也检测到携带植物miRNA的ELNs可发挥中药生物活性作用^[38]。细胞外的miRNA还可通过高密度脂蛋白(high-density lipoprotein, HDL)被递送至受体细胞^[44]。另外,研究发现^[15]在血清和血浆中检测到超过

一半的植物miRNA存在于微泡(microvesicles, MVs)中,并通过体外实验证明,来自结肠上皮细胞分泌的MVs可以将外源植物miRNA递送至相应器官的靶细胞并调节受体细胞功能。虽然目前这种吸收机制尚未被阐明,但是可以猜测植物来源的miRNA到受体细胞的途径可能如下:通过口服将植物机械粉碎,在胃肠道中,植物miRNA从被破坏的细胞中释放出来并转移至小肠细胞中,通过掺入某些蛋白质或囊泡中成为可吞噬的外泌体,它们会被分泌至循环系统进而递送至靶细胞。Yang等^[18]研究了在各种压力或营养不良等疾病状态下导致“肠道泄漏”症状的表型,这种由疾病或相关治疗引起的肠道通透性改变或损坏可以增强食物miRNA的摄取。为了更好地发挥植物miRNA的治疗潜力,其分子吸收机制是目前亟待解决的一个问题。

2.3 植物miRNA跨界调控的作用机制

在讨论miRNA作用机制之前,有必要讨论在20多年前发现的RNA干扰(RNA interference, RNAi)现象。Napoli等^[45]发表了在转基因牵牛花中观察到的基因沉默现象,导入的外源基因使内源同源基因的mRNA水平发生了下调。Fire等^[46]首次报道双链RNA(double-stranded RNA, dsRNA)可以引发秀丽隐杆线虫(*Caenorhabditis elegans*)中互补mRNA序列的基因沉默,并将这种现象命名为“RNAi”,表现为一种转录后基因沉默现象(post-transcriptional gene silencing, PTGS)。Zamore等^[47]证明了由dsRNA产生的21~23 nt的siRNA(small interference RNA)是发挥PTGS的序列特异性介质,dsRNA产生的21~23 nt片段介导切割相关mRNA。

与siRNA相似,miRNA也以PTGS方式抑制基因表达,siRNA和miRNA的经典沉默机制如图2所示^[48]。在动植物细胞中,miRNA基因转录是通过RNA聚合酶II在细胞核中进行的,产生初级miRNA(pri-miRNA),然后pri-miRNA被切割,形成前体miRNA(pre-miRNA),pre-miRNA随后被exportin 5从细胞核转运至细胞质,随后被Dicer酶进一步加工成19~25个nt的miRNA双链体。在这里,1条miRNA和Argonaute(AGO)蛋白结合(不和AGO结合的miRNA*会被降解),形成RISC(RNA-induced silencing complex)复合物,通过“miRNA-mRNA”的序列配对,结合到目标mRNA上。mRNA和成熟miRNA之间的互补配对通常发生在前者的3'非编码区(3' untranslated region, 3' UTR)和后者种子区(从5'端开始的2~7 nt)。很多情况下,序列只是部分匹配,会抑制蛋白质翻译,极少数情况下序列高度匹配,会引起mRNA切割以及降解,这种机制类似于siRNA介导的基因沉默^[49]。

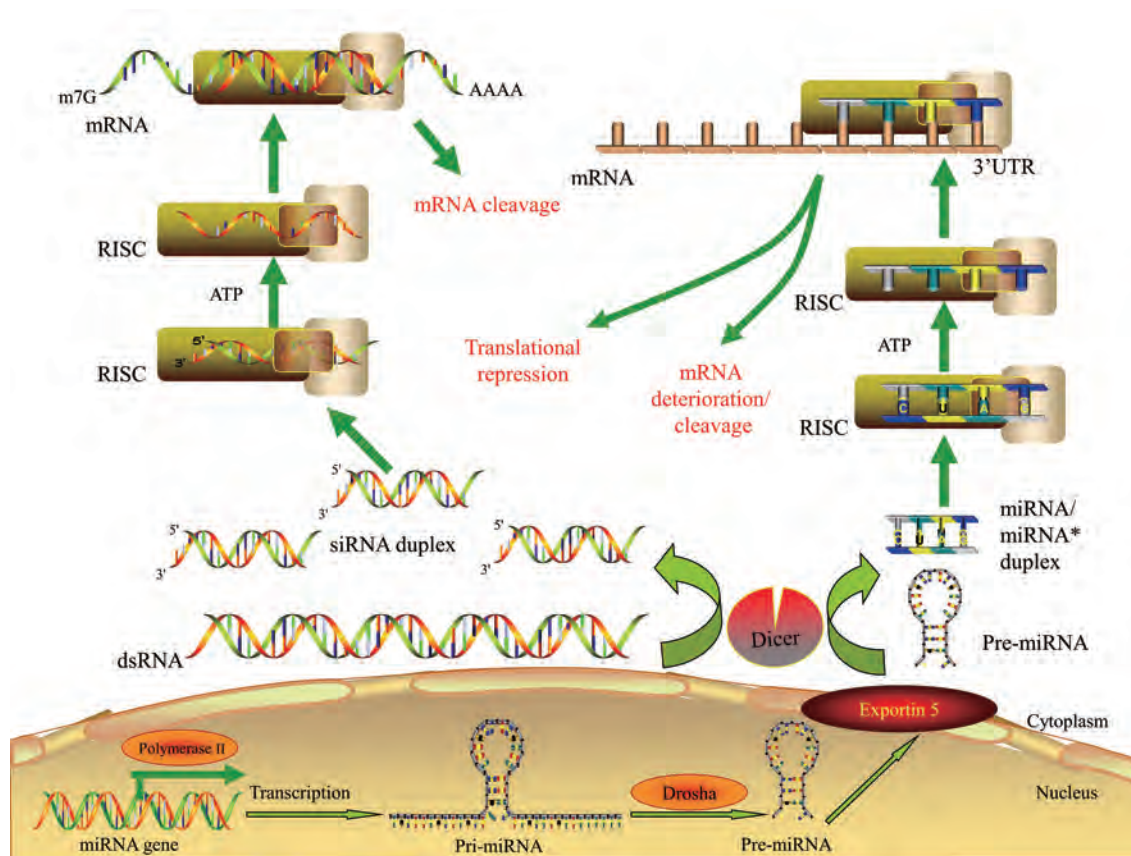


Figure 2 Classical post-transcriptional gene silencing mechanisms of small interference RNA (siRNA) and miRNA. RISC: RISC is assembled by Dicer enzyme, AGO protein, small RNA, and other biological macromolecules. siRNA: Double strand RNA (dsRNA) (either transcribed or artificially introduced) is processed by Dicer into siRNA which is loaded into the RISC. The guide strand of siRNA guides the RISC to the target mRNA. The full complementary binding between the guide strand of siRNA and the target mRNA leads to the cleavage of mRNA; miRNA: Transcription of miRNA gene is carried out by RNA polymerase II in the nucleus to give pri-miRNA, which is then cleaved by Drosha to form pre-miRNA. The pre-miRNA is transported by exportin 5 to the cytoplasm where it is processed by Dicer into miRNA. The miRNA is loaded into the RISC where one strand is discarded, and the RISC is guided by the remaining strand to the target mRNA through partially complementary binding. The target mRNA is inhibited *via* translational repression, degradation, or cleavage; miRNA/miRNA*: Denoting the miRNA duplex, one miRNA binds to the AGO protein, miRNA* that does not bind to AGO protein will be degraded; m7G: 7-Methylguanine; AAAA: Poly-adenosine tail; ATP: Adenosine triphosphate

另外, 对于植物和动物, 其 miRNA 进化上二者是相互独立的, 由此导致二者在序列、前体以及成熟过程等方面都有所差异 (表 1)^[45,50-53]。虽然成熟的植物 miRNA 与动物 miRNA 都可与 AGO 蛋白结合形成 RISC, 二者的 miRNA 均通过碱基互补配对方式引导 RISC 识别靶基因, 从而影响靶基因相关功能^[54-56], 但是植物 miRNA 和自身目标 mRNA 的结合往往需要高度序列匹配, 一旦结合, 可直接降解目标 mRNA, 而动物 miRNA 与自身目标 mRNA 的结合则允许错配。但是对植物 miRNA 跨界调控的研究发现^[15], 植物 miR168a 可以降低哺乳动物体内 LDLRAP-1 蛋白表达, 但不影响其 mRNA 水平, 表明植物来源 miR168a 具有类似哺乳动物功能性 miRNA 的功能, 从而调节哺乳动物 LDLRAP-1 的翻译。此外, 植物 miR156a^[26]通

过与人主动脉内皮细胞中目标 mRNA 的 3' UTR 不完全互补 (4 nt 不匹配), 降低了 JAM-A 蛋白含量以及其 mRNA 表达, 抑制 JAM-A 基因的转录后翻译, 进一步证实植物 miRNA 在行使跨界调控功能中, 与哺乳动物 miRNA 调控自身基因表达具有相似性。另外, 研究表明哺乳动物对植物 miRNA 的摄取不一定与植物中 miRNA 的丰度有关, 但是这些 miRNA 如需发挥生物学功能必须达到一定的浓度, 通常认为 miRNA 执行其功能需要每个细胞含有 100 个拷贝的阈值浓度^[20]。

3 植物 miRNA 的应用前景探讨

植物 miRNA 的跨界调控现象为中药活性成分的寻找打开了新的视角, 为阐明中药的药效物质基础提供了有力的条件。那么如何对植物 miRNA 活性成分进行发掘, 以及对创新药物开发有何启示, 如何利用跨

Table 1 Similarities and differences of miRNAs and siRNAs. nt: Nucleotide; RNA Pol: RNA polymerase; DCL1: Dicer-like 1; HEN1: Hua enhancer 1; UTR: Untranslated region

Characteristic	Plants' miRNA	Animals' miRNA	siRNA
First reported in the literature	2002 (<i>Arabidopsis thaliana</i>) ^[52]	1993 (<i>Caenorhabditis elegans</i>) ^[53]	1990 (<i>Petunia</i>) ^[45]
Location in the genome	Most are located in regions between protein-coding genes	Most are located in regions between protein-coding genes, and also exist in the intron regions	From transposons, transgenic, or viral exogenously transcribed genes
Mature RNA length	19–25 nt	19–25 nt	21–23 nt
Pre-miRNA length	60–300 nt	70–90 nt	None, converted from dsRNA
Mature RNA structure	It is usually relatively stable with methylation modifications at the 3' end	No methylation modification at 3' end, it has free hydroxyl group	No methylation modification at 3' end
Key enzymes	RNA Pol II, RNA Pol III, DCL1, and HEN1	RNA Pol II, RNA Pol III, Drosha, Dicer, and exportin 5	Dicer
Biosynthetic location	Nucleus	Nucleus and cytoplasm	Typically exogenous import
Pairing with target gene	Highly matched	Mismatches are allowed	Highly matched
Target site	Mainly in coding sequence, secondly in 3' UTR and 5' UTR regions	Mainly in 3' UTR	Typically in coding sequence
Mechanism of repression	mRNA cleavage	Transcriptional repression and mRNA cleavage or degradation	mRNA cleavage

界调控这一现象来为人类服务都值得进一步的研究与探讨。

3.1 中药 miRNA 活性成分的发掘

中药的药效物质基础不仅仅局限于次级代谢产物(多酚、生物碱、单宁、皂苷等),也可能是 miRNA 等核酸类物质。很多中药的次级代谢产物的具体作用机制通过体内外实验很难被阐明,例如金银花^[20]的抗病毒作用机制以及有效成分、冬虫夏草^[57]提高人体免疫功能的具体机制等,如果从 miRNA 的角度去探讨,这些问题也许可提供新思路。由于中药和 miRNAs 均具有多靶点的作用特点,通过基因、蛋白和疾病等相关数据库,利用分析软件全面系统地从网络层面找到分子作用的相关靶点及通路,观察分子对疾病的作用与影响,构建中药 miRNA 及其预测靶基因作用网络,能够大幅度降低单纯实验筛选的盲目性,提升研究效率。

Zhang 等^[58]利用 PageRank 算法提取中心节点构建了植物 miRNA 跨物种调控模块,并将模块功能归纳为 3 个类别:离子转运、代谢过程和应激反应。通过基因本体论(Gene Ontology, GO)和 KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) 通路分析,发现人类血浆中的植物 miRNA 的靶标与植物 miRNA 自身的靶标具有某些功能相似性。研究发现外源植物 miRNA 的靶标与消化和泌尿器官之间存在紧密联系,这种新颖的计算方法为发现更多靶向人类的植物 miRNA 提供了帮助。Kumar 等^[59]通过生物信息学方法分析药用植物喜树在抗癌方面的作用,研究其可能的跨界调控机制以及源自该植物的 miRNA 是否参与调控癌症相关信号通路。经功能富集分析发现,14 个喜树 miRNA 可以调节人类的 152 个靶基因,并且这些靶基因与乳腺癌、

白血病和肺癌等癌症相关。目前,计算机系统生物学方法是分析植物以及中药来源 miRNA 跨物种调控作用靶点的有效手段,在此基础上进一步通过实验验证,可发掘中药 miRNA 活性成分,更好地阐明 miRNA 的跨物种调控相关表观遗传机制。

3.2 小核酸药物开发

小核酸药物又称 RNAi 技术药物,具有基因靶向特异性强、研发周期短、候选靶点广泛、转化基础深厚等特点,已成为药物研发行业的必争之地。2018 年 8 月,美国食品药品监督管理局(Food and Drug Administration, FDA)首次批准了 Alnylam 制药公司的 RNAi 的治疗药物: Patisiran (Onpattro) 可以通过减少患者体内致病突变蛋白的产生,治疗遗传性转甲状腺素蛋白淀粉样变性。当前小核酸药物开发的挑战之一就是如何高效稳定地递送药物到达靶器官和组织,从而发挥作用。

研究已证实了植物 miRNA 在癌症治疗中的潜力^[60],在成熟的结直肠癌 *Apc^{Min/+}* 小鼠模型中,口服抑癌药 miRNA 混合物可有效降低小鼠肿瘤负荷。该混合物包含 3 个经过验证的抑癌 miRNA (miR-34a、miR-143 和 miR-145),它们被设计为有植物特征的 miRNA,即在 3' 末端的 2' 位置带有 1 个甲氧基末端,这种植物 miRNA 可以被哺乳动物的消化道吸收,并发挥降低小鼠肿瘤负荷作用。如果将这项技术扩展到其他 miRNA 相关疾病,针对特定靶标设计新型植物工程化的 miRNA,则可作为有效、无毒、廉价的化学预防策略,具有一定的临床应用潜力。另外,研究报道^[61]红景天煎剂中油溶性化学物质磷酸胆碱(大多数在蒲公英、穿心莲、金银花等中药中被发现),其可与 miRNA 形成脂质体进入人类肺泡和胃上皮细胞,保护其在进入细胞的过程

中免受核酸酶降解的影响,这种miRNA可以通过脂质复合物途径进入体内,为口服miRNAs作为治疗药物提供了理论依据。

另外,小核酸药物开发面临的另一个挑战是其安全性问题。Minutolo等^[62]发现橄榄油小RNA(olea europaea small RNAs, oeu-sRs)在抗肿瘤调节中具有与人类miR-34a(has-miR34a)功能同源性,在不同肿瘤细胞中转染合成的oeu-sRs可以降低has-miR34a靶标mRNA的表达,引起肿瘤细胞的凋亡和增殖抑制。并且在缺乏has-miR-34a的肿瘤细胞中引入oeu-sRs可以恢复其抑癌能力,而内源性has-miR34a正常表达的细胞仍不受影响,表明从植物来源miRNA开发天然无毒药物的可能性。而相关研究提示,同一miRNA可以调控多个mRNA分子,不同的miRNA分子也可以协同调控相同的mRNA分子,O'Day等^[63]利用Ingenuity软件制作了与乳腺癌发病相关的11种miRNA及其34个已知靶标的直接相互作用网络,表明多种miRNA与多种乳腺癌基因相互作用并相互联系,这种多对多的miRNA-靶基因网络凸显了miRNA治疗乳腺癌的药效优势,可以通过拮抗或过表达单个miRNA来实现整体的调控。但同时,这种广泛的基因干扰又具有很大的风险问题,某些miRNA的表达失调将改变许多基因的表达,继而诱导肿瘤的发生。目前植物miRNA跨界调控的研究大多处于体外细胞水平,未来科研人员将植物miRNA开发成药时,在把控其安全性方面任重而道远。

3.3 以植物为载体的药物开发

研究发现植物miRNA被摄食进入人体内并不会被完全降解,反而参与人体的代谢循环,并调控人体内基因表达,该发现为以食物作为药物载体治疗某些疾病的策略奠定了基础。Xiao等^[64]从11种可食用的水果和蔬菜中鉴定出外泌体样纳米粒(edible plant-derived exosome-like nanoparticles, EPDELNs)的miRNA,靶标预测和功能分析表明EPDELNs中高表达的miRNA可能与调节炎症性细胞因子和癌基因表达有关。虽然这种纳米粒的吸收和作用机制尚未阐明,但是却提示人们植物来源可食用的纳米粒作为药物载体可能会更优于合成纳米粒。

Zhang等^[65]通过基因编辑方式,成功在生菜中构建出针对HBsAg(hepatitis B surface antigen)基因(乙型肝炎病毒的靶点)的siRNA序列,使得经过改造的生菜被食用后,其特异的能够干扰HBsAg基因的RNA序列可以被人体吸收并特异性结合及抑制HBsAg基因的表达,而给予HBsAg^{-/-}转基因小鼠长期食用后,小鼠的肝损伤得到缓解,并且没有观察到相应的毒性

反应。这些结果有力地表明,食用植物内源性miRNA来发挥药用siRNA作用是解决siRNA稳定性问题以及减少RNAi疗法中潜在副作用的一种新方法。目前,对于这种基因修饰食物的安全性尚存在争议,因此需要更多的毒理学实验来验证这种基因修饰食物的安全性,从而更好地被人们应用。

4 总结与展望

食用植物及植物药中miRNA可以跨界调控哺乳动物生理、病理功能的现象已经得到了大量实验验证,这也证明了中药包含的植物miRNA可能是药用植物的一种活性成分。目前发掘新的植物源功能miRNA的主要手段是通过高通量测序^[66]、miRNA芯片技术^[67]、qRT-PCR^[68]、Northern blotting^[69]、原位杂交(*in situ* hybridization, ISH)^[70]等实验方法构建miRNA表达谱,进而通过生物信息学方法^[71,72]、数据库来预测分析miRNA潜在的功能,最后通过体内外生物学实验进行功能验证。另外,受植物miRNA跨界调控启发,中药中动物药也可依照此策略进行动物药中是否存在潜在药理活性miRNA的分析,Chen等^[73]通过对生龟甲进行转录组测序发现了生龟甲在炮制加工后存在未降解的miRNA,其中龟甲xtr-miR-22的靶基因预测结果显示其具有治疗早幼粒细胞白血病的潜在药理活性。

从近期研究来看,植物miRNA确实具有一定的治疗作用,其含有的miRNA可以利用外泌体为载体跨界调控其他物种基因的表达,以达到抗炎、抗病毒、抗纤维化、抗肿瘤等作用。外泌体是哺乳动物细胞分泌的微囊泡,是天然的胞间信息载体,以其良好的生物相容性,低免疫原性和循环稳定性等在核酸类药物载体领域存在巨大应用潜力^[74,75]。但是由于外泌体产量低,纯化操作繁琐等技术难题,研究者多采用外泌体与纳米材料相结合的方法实现药物的可控释放和精准治疗^[76]。利用人工合成模拟外泌体的方法,设计和合成具有外泌体类似结构的颗粒,不仅可以大规模生产人工外泌体,这种结构还改善了纳米粒的表面性能,增强其稳定性^[77]。Yong等^[78]结合天然生物材料(例如细胞或细胞膜)的独特功能以及仿生纳米粒,构建了一种肿瘤细胞外排的外泌体仿生多孔硅纳米粒(E-PSiNPs),用于肿瘤干细胞的靶向给药,这种外泌体仿生纳米粒不干扰外泌体膜上的功能蛋白质完整性,具有高靶向性和高产量的特性。同时,出于对外泌体安全性和实现大规模制备的考虑,利用葡萄、柚子等植物或牛奶作为外泌体的替代供体来源是个不错的选择^[79-81]。通过构建植物来源的新型纳米粒作为小核酸药物递送的新载体,能够更好地为人类健康服务。

植物来源miRNA跨物种调控研究仍处于早期

探索阶段,还有很多问题亟待解决,例如:中药 miRNA 在制备和消化过程中的稳定性机制、其在肠道中的吸收机制、以及这些 miRNA 在动植物体内的存在形式、组织分布以及生物利用度等等。鉴于中药制剂中 miRNA 降解动力学和相关分子机制仍不清楚,未来应深入探讨植物 miRNA 是如何跨胃肠道吸收、以及如何将 miRNA 结合宿主 RISC 启动沉默机制等。对这个新兴领域的探索,不仅能够增强人们对药用植物来源 miRNA 的了解,还将有可能开辟出预防或治疗人类疾病的新方法。

References

- [1] Bartel DP. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function [J]. *Cell*, 2004, 116: 281-297.
- [2] He L, Hannon GJ. MicroRNAs: small RNAs with a big role in gene regulation [J]. *Nat Rev Genet*, 2004, 5: 522-531.
- [3] Liang Y, Ridzon D, Wong L, et al. Characterization of microRNA expression profiles in normal human tissues [J]. *BMC Genomics*, 2007, 8: 166.
- [4] Babak T, Zhang W, Morris Q, et al. Probing microRNAs with microarrays: tissue specificity and functional inference [J]. *RNA*, 2004, 10: 1813-1819.
- [5] Hwang HW, Mendell JT. MicroRNAs in cell proliferation, cell death, and tumorigenesis [J]. *Br J Cancer*, 2006, 94: 776-780.
- [6] Huang L, Wang X, Wen C, et al. Hsa-miR-19a is associated with lymph metastasis and mediates the TNF-alpha induced epithelial-to-mesenchymal transition in colorectal cancer [J]. *Sci Rep*, 2015, 5: 13350.
- [7] Li J, Zhang Y, Li D, et al. Small non-coding RNAs transfer through mammalian placenta and directly regulate fetal gene expression [J]. *Protein Cell*, 2015, 6: 391-396.
- [8] Tavazoie SF, Alarcón C, Oskarsson T, et al. Endogenous human microRNAs that suppress breast cancer metastasis [J]. *Nature*, 2008, 451: 147-152.
- [9] Vegter EL, van der Meer P, de Windt LJ, et al. MicroRNAs in heart failure: from biomarker to target for therapy [J]. *Eur J Heart Fail*, 2016, 18: 457-468.
- [10] Zhao Y, Cong L, Lukiw WJ. Plant and animal microRNAs (miRNAs) and their potential for inter-kingdom communication [J]. *Cell Mol Neurobiol*, 2018, 38: 133-140.
- [11] Hughes DT, Sperandio V. Inter-kingdom signalling: communication between bacteria and their hosts [J]. *Nat Rev Microbiol*, 2008, 6: 111-120.
- [12] Lecellier CH, Dunoyer P, Arar K, et al. A cellular microRNA mediates antiviral defense in human cells [J]. *Science*, 2005, 308: 557-560.
- [13] Zhang GL, Li YX, Zheng SQ, et al. Suppression of hepatitis B virus replication by microRNA-199a-3p and microRNA-210 [J]. *Antiviral Res*, 2010, 88: 169-175.
- [14] Weiberg A, Wang M, Lin FM, et al. Fungal small RNAs suppress plant immunity by hijacking host RNA interference pathways [J]. *Science*, 2013, 342: 118-123.
- [15] Zhang L, Hou D, Chen X, et al. Exogenous plant MIR168a specifically targets mammalian LDLRAP1: evidence of cross-kingdom regulation by microRNA [J]. *Cell Res*, 2012, 22: 107-126.
- [16] Dickinson B, Zhang Y, Petrick JS, et al. Lack of detectable oral bioavailability of plant microRNAs after feeding in mice [J]. *Nat Biotechnol*, 2013, 31: 965-967.
- [17] Wang K, Li H, Yuan Y, et al. The complex exogenous RNA spectra in human plasma: an interface with human gut biota? [J]. *PLoS One*, 2012, 7: e51009.
- [18] Yang J, Farmer LM, Agyekum AA, et al. Detection of dietary plant-based small RNAs in animals [J]. *Cell Res*, 2015, 25: 517-520.
- [19] Yang J, Farmer LM, Agyekum AA, et al. Detection of an abundant plant-based small RNA in healthy consumers [J]. *PLoS One*, 2015, 10: e0137516.
- [20] Zhou Z, Li X, Liu J, et al. Honeysuckle-encoded atypical microRNA2911 directly targets influenza A viruses [J]. *Cell Res*, 2015, 25: 39-49.
- [21] Li M, Chen T, He JJ, et al. Plant MIR167e-5p inhibits enterocyte proliferation by targeting β -catenin [J]. *Cells*, 2019, 8: E1385.
- [22] Chin AR, Fong MY, Somlo G, et al. Cross-kingdom inhibition of breast cancer growth by plant miR159 [J]. *Cell Res*, 2016, 26: 217-228.
- [23] Cavalieri D, Rizzetto L, Tocci N, et al. Plant microRNAs as novel immunomodulatory agents [J]. *Sci Rep*, 2016, 6: 25761.
- [24] Xiang J, Huang JC, Xu C, et al. Effect of miRNA from *Glycyrrhiza uralensis* decoction on gene expression of human immune cells [J]. *China J Chin Mater Med (中国中药杂志)*, 2017, 42: 1752-1756.
- [25] Shen CB, Yu L, Gu YN, et al. Inhibited expression of GATA-3 on Th2 cells transfect *Astragalus*-derived miR-396 of asthmatic mice *in vivo* [J]. *Chin J Immunol (中国免疫学杂志)*, 2019, 35: 3001-3007.
- [26] Hou D, He F, Ma L, et al. The potential atheroprotective role of plant MIR156a as a repressor of monocyte recruitment on inflamed human endothelial cells [J]. *J Nutr Biochem*, 2018, 57: 197-205.
- [27] Peng MY, Wang YF. Advances in research on regulation of mammalian gene expression by plant microRNA [J]. *J Guangdong Pharm Uni (广东药科大学学报)*, 2019, 35: 714-718.
- [28] Huang F, Du J, Liang Z, et al. Large-scale analysis of small RNAs derived from traditional Chinese herbs in human tissues [J]. *Sci China Life Sci*, 2019, 62: 321-332.
- [29] Luo Y, Wang P, Wang X, et al. Detection of dietetically absorbed maize-derived microRNAs in pigs [J]. *Sci Rep*, 2017, 7: 645.
- [30] Wang Y, Peng M, Wang W, et al. Verification of miRNAs in

- ginseng decoction by high-throughput sequencing and quantitative real-time PCR [J]. *Heliyon*, 2019, 5: e01418.
- [31] Xie W, Melzig MF. The stability of medicinal plant microRNAs in the herb preparation process [J]. *Molecules*, 2018, 23: E919.
- [32] Shen CB, Cai H, Yu L. miRNA library and thermodynamic stability of *Astragali Radix* decoction pieces [J]. *Chin Tradit Herbal Drugs (中草药)*, 2015, 46: 3079-3085.
- [33] Philip A, Ferro VA, Tate RJ. Determination of the potential bioavailability of plant microRNAs using a simulated human digestion process [J]. *Mol Nutr Food Res*, 2015, 59: 1962-1972.
- [34] Yang J, Hotz T, Broadnax L, et al. Anomalous uptake and circulatory characteristics of the plant-based small RNA MIR2911 [J]. *Sci Rep*, 2016, 6: 26834.
- [35] Li J, Yang Z, Yu B, et al. Methylation protects miRNAs and siRNAs from a 3'-end uridylation activity in *Arabidopsis* [J]. *Curr Biol*, 2005, 15: 1501-1507.
- [36] Zhao Y, Mo B, Chen X. Mechanisms that impact microRNA stability in plants [J]. *RNA Biol*, 2012, 9: 1218-1223.
- [37] Köberle V, Pleli T, Schmithals C, et al. Differential stability of cell-free circulating microRNAs: implications for their utilization as biomarkers [J]. *PLoS One*, 2013, 8: e75184.
- [38] Li X, Liang Z, Du J, et al. Herbal decoctosome is a novel form of medicine [J]. *Sci China Life Sci*, 2019, 62: 333-348.
- [39] Mathivanan S, Ji H, Simpson RJ. Exosomes: extracellular organelles important in intercellular communication [J]. *J Proteomics*, 2010, 73: 1907-1920.
- [40] van der Pol E, Böing AN, Harrison P, et al. Classification, functions, and clinical relevance of extracellular vesicles [J]. *Pharmacol Rev*, 2012, 64: 676-705.
- [41] Wang B, Zhuang X, Deng ZB, et al. Targeted drug delivery to intestinal macrophages by bioactive nanovesicles released from grapefruit [J]. *Mol Ther*, 2014, 22: 522-534.
- [42] Zhao Z, Yu S, 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]. *J Agric Food Chem*, 2018, 66: 2749-2757.
- [43] Teng Y, Ren Y, Sayed M, et al. Plant-derived exosomal microRNAs shape the gut microbiota [J]. *Cell Host Microbe*, 2018, 24: 637-652.
- [44] Vickers KC, Palmisano BT, Shoucri BM, et al. MicroRNAs are transported in plasma and delivered to recipient cells by high-density lipoproteins [J]. *Nat Cell Biol*, 2011, 13: 423-433.
- [45] Napoli C, Lemieux C, Jorgensen R. Introduction of a chimeric chalcone synthase gene into petunia results in reversible co-suppression of homologous genes in trans [J]. *Plant Cell*, 1990, 2: 279-289.
- [46] Fire A, Xu S, Montgomery MK, et al. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans* [J]. *Nature*, 1998, 391: 806-811.
- [47] Zamore PD, Tuschl T, Sharp PA, et al. RNAi: double-stranded RNA directs the ATP-dependent cleavage of mRNA at 21 to 23 nucleotide intervals [J]. *Cell*, 2000, 101: 25-33.
- [48] Carthew RW, Sontheimer EJ. Origins and mechanisms of miRNAs and siRNAs [J]. *Cell*, 2009, 136: 642-655.
- [49] Kim VN, Han J, Siomi MC. Biogenesis of small RNAs in animals [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2009, 10: 126-139.
- [50] Chapman EJ, Carrington JC. Specialization and evolution of endogenous small RNA pathways [J]. *Nat Rev Genet*, 2007, 8: 884-896.
- [51] Millar AA, Waterhouse PM. Plant and animal microRNAs: similarities and differences [J]. *Funct Integr Genomics*, 2005, 5: 129-135.
- [52] Reinhart BJ, Weinstein EG, Rhoades MW, et al. MicroRNAs in plants [J]. *Genes Dev*, 2002, 16: 1616-1626.
- [53] Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14* [J]. *Cell*, 1993, 75: 843-854.
- [54] Baumberg N, Baulcombe DC. *Arabidopsis* ARGONAUTE1 is an RNA Slicer that selectively recruits microRNAs and short interfering RNAs [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2005, 102: 11928-11933.
- [55] Qi Y, Denli AM, Hannon GJ. Biochemical specialization within *Arabidopsis* RNA silencing pathways [J]. *Mol Cell*, 2005, 19: 421-428.
- [56] Vaucheret H. Post-transcriptional small RNA pathways in plants: mechanisms and regulations [J]. *Genes Dev*, 2006, 20: 759-771.
- [57] Zhang W, Li X, Ma L, et al. Identification of microRNA-like RNAs in *Ophiocordyceps sinensis* [J]. *Sci China Life Sci*, 2019, 62: 349-356.
- [58] Zhang H, Li Y, Liu Y, et al. Role of plant microRNA in cross-species regulatory networks of humans [J]. *BMC Syst Biol*, 2016, 10: 60.
- [59] Kumar D, Kumar S, Ayachit G, et al. Cross-kingdom regulation of putative miRNAs derived from happy tree in cancer pathway: a systems biology approach [J]. *Int J Mol Sci*, 2017, 18: E1191.
- [60] Mlotshwa S, Pruss GJ, MacArthur JL, et al. A novel chemopreventive strategy based on therapeutic microRNAs produced in plants [J]. *Cell Res*, 2015, 25: 521-524.
- [61] Du J, Liang Z, Xu J, et al. Plant-derived phosphocholine facilitates cellular uptake of anti-pulmonary fibrotic HJT-sRNA-m7 [J]. *Sci China Life Sci*, 2019, 62: 309-320.
- [62] Minutolo A, Potestà M, Gismondi A, et al. *Olea europaea* small RNA with functional homology to human miR34a in cross-kingdom interaction of anti-tumoral response [J]. *Sci Rep*, 2018, 8: 12413.
- [63] O'Day E, Lal A. MicroRNAs and their target gene networks in breast cancer [J]. *Breast Cancer Res*, 2010, 12: 201.
- [64] Xiao J, Feng S, Wang X, et al. Identification of exosome-like nanoparticle-derived microRNAs from 11 edible fruits and vegetables [J]. *PeerJ*, 2018, 6: e5186.

- [65] Zhang S, Sang X, Hou D, et al. Plant-derived RNAi therapeutics: a strategic inhibitor of HBsAg [J]. *Biomaterials*, 2019, 210: 83-93.
- [66] Hrdlickova R, Toloue M, Tian B. RNA-Seq methods for transcriptome analysis [J]. *Wiley Interdiscip Rev RNA*, 2017, 8. DOI: 10.1002/wrna.1364.
- [67] Li W, Ruan K. MicroRNA detection by microarray [J]. *Anal Bioanal Chem*, 2009, 394: 1117-1124.
- [68] Chen C, Ridzon DA, Broomer AJ, et al. Real-time quantification of microRNAs by stem-loop RT-PCR [J]. *Nucleic Acids Res*, 2005; 33: e179.
- [69] Válczi A, Hornyik C, Varga N, et al. Sensitive and specific detection of microRNAs by northern blot analysis using LNA-modified oligonucleotide probes [J]. *Nucleic Acids Res*, 2004, 32: e175.
- [70] Nielsen BS. MicroRNA *in situ* hybridization [J]. *Methods Mol Biol*, 2012, 822: 67-84.
- [71] Gorski SA, Vogel JR, Doudna JA. RNA-based recognition and targeting: sowing the seeds of specificity [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2017, 18: 215-228.
- [72] Steinkraus BR, Toegel M, Fulga TA. Tiny giants of gene regulation: experimental strategies for microRNA functional studies [J]. *Wiley Interdiscip Rev Dev Biol*, 2016, 5: 311-362.
- [73] Chen MY, Hu XS, Xu Z, et al. Study on preliminary screening of miRNAs with potential pharmacological activity in *Plastrum Testudinis* [J]. *Mod Chin Med (中国现代中药)*, 2018, 20: 395-401.
- [74] Vader P, Mol EA, Pasterkamp G, et al. Extracellular vesicles for drug delivery [J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2016, 106: 148-156.
- [75] Farooqi AA, Desai NN, Qureshi MZ, et al. Exosome biogenesis, bioactivities and functions as new delivery systems of natural compounds [J]. *Biotechnol Adv*, 2018, 36: 328-334.
- [76] Wang J, Dong Y, Li Y, et al. Designer exosomes for active targeted chemo-photothermal synergistic tumor therapy [J]. *Adv Funct Mater*, 2018: 1707360.
- [77] Deng S, Zhang LM, Wang P, et al. Design and *in vitro* evaluation of delivery systems for co-delivery of siRNA and proteins by mimetic exosomes [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2020, 55: 139-145.
- [78] Yong T, Zhang X, Bie N, et al. Tumor exosome-based nanoparticles are efficient drug carriers for chemotherapy [J]. *Nat Commun*, 2019, 10: 3838.
- [79] Ju S, Mu J, Dokland T, et al. Grape exosome-like nanoparticles induce intestinal stem cells and protect mice from DSS-induced colitis [J]. *Mol Ther*, 2013, 21: 1345-1357.
- [80] Wang Q, Ren Y, Mu J, et al. Grapefruit-derived nanovectors use an activated leukocyte trafficking pathway to deliver therapeutic agents to inflammatory tumor sites [J]. *Cancer Res*, 2015, 75: 2520-2529.
- [81] Munagala R, Aqil F, Jeyabalan J, et al. Bovine milk-derived exosomes for drug delivery [J]. *Cancer Lett*, 2016, 371: 48-61.