

药食两用植物细胞外囊泡样纳米粒的制备和性能研究

李思敏¹, 何凤军¹, 秦琳茜², 杨凯宇¹, 乔宏志^{1,2*}

(1. 南京中医药大学药学院, 江苏省中药功效物质重点实验室, 江苏 南京 210023; 2. 江苏省中药高效给药系统工程技术研究中心, 江苏 南京 210023)

摘要: 从可食用植物中分离到的细胞外囊泡样纳米粒 (extracellular vesicle-like nanoparticles, EVNs) 被证明具有多重活性, 而药源性植物EVNs鲜有报道。本文选择药食两用的鲜姜黄、鲜百合、鲜黄精和鲜天麻, 从其药用部位鲜榨汁液中分离到EVNs, 并研究了EVNs的理化性质、抗氧化能力和细胞摄取行为。结果表明, 不同来源EVNs的粒径分布在150~200 nm之间, 多分散系数均小于0.2; 不同EVNs均含有脂质、蛋白质和糖类成分, 但含量不同; 4种EVNs在4 °C和-80 °C条件下储存的稳定性不同, 其中姜黄来源EVNs稳定性最佳; 抗氧化实验证实, 4种EVNs具有不同的抗氧化活性, 破坏EVNs结构能明显降低其抗氧化能力; 摄取实验表明, RAW264.7细胞对不同EVNs的摄取能力不同, 破坏EVNs结构可影响EVNs的摄取, 证明EVNs的活性和转运性质与其特定结构有关。

关键词: 药食同源; 细胞外囊泡; 外泌体; 纳米粒; 稳定性; 抗氧化; 摄取; 结构中药学

中图分类号: R943 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2021)08-2086-07

Preparation and properties of extracellular vesicle-like nanoparticles from medicinal and edible plants

LI Si-min¹, HE Feng-jun¹, QIN Lin-xi², YANG Kai-yu¹, QIAO Hong-zhi^{1,2*}

(1. Jiangsu Key Laboratory for Functional Substance of Chinese Medicine, School of Pharmacy, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210023, China; 2. Jiangsu Engineering Research Center for Efficient Delivery System of TCM, Nanjing 210023, China)

Abstract: Extracellular vesicle-like nanoparticles (EVNs) isolated from edible plants have been shown to have multiple activities, while EVNs from medicinal plants have rarely been reported. In this paper, medicinal parts of medicinal and edible homologous fresh *Curcuma Longae Rhizoma* (CLR), *Lilii Bulbus* (LB), *Polygonati Rhizoma* (PR), and *Gastrodiae Rhizoma* (GR) are used to squeeze juice to collect EVNs. The physical and chemical properties, antioxidant capacity, and cellular uptake behavior of EVNs are determined. The results show that the particle size of EVNs from different sources ranges from 150 nm to 200 nm, and the polydispersity index (PDI) values of four EVNs are less than 0.2. Different EVNs all contain lipids, proteins, and carbohydrates, but their contents are different. The stability of EVNs is different at 4 °C and -80 °C, among which the CLR-derived EVNs are most stable. Antioxidant experiments confirm that the four EVNs have different antioxidant activities while structural damage of EVNs leads to the reduced antioxidant capacity. Cellular uptake studies prove that four EVNs differ in the uptake capacity by RAW264.7 cells, which is associated with the structural interference of EVNs. The available evidence implies that the specific structure of EVNs may be necessary to their pharmacological activity and transport property.

收稿日期: 2021-04-15; 修回日期: 2021-05-18.

基金项目: 中央本级重大增减支项目 (2060302-1907-04); 中国科协青年人才托举工程项目 (2017QNRC001); 江苏省高等学校自然科学研究重大项目 (20KJA360004); 江苏省六大人才高峰项目 (SWYY-057); 江苏省青蓝工程项目 (013031006004); 江苏省研究生创新工程项目 (SJCX20_0546, SJCX20_0547, KYCX20_1497).

*通讯作者 Tel: 86-25-85811050, E-mail: qiaohz@njucm.edu.cn

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2021-0554

Key words: medicine food homology; extracellular vesicle; exosome; nanoparticle; stability; antioxidation; uptake; structural Chinese medicine

植物来源囊泡样纳米粒 (extracellular vesicle-like nanoparticles, EVNs) 是从植物鲜榨汁液中分离得到的一类纳米级膜性小泡, 含有脂质、蛋白质、多糖、核酸和其他小分子成分等^[1]。2013年, Zhang 课题组^[2]从葡萄汁中分离到 EVNs, 发现其能够靶向肠干细胞并介导肠组织重构, 从而拮抗葡聚糖硫酸钠 (DSS) 诱导的结肠炎。由于 EVNs 分离简便、产率较高且活性明显, 引起业内广泛关注, 随后有多篇报道称从不同可食用鲜榨果蔬汁中可分离到 EVNs, 并证明其具有与源植物类似的活性^[3]。例如, 花椰菜中分离到的 EVNs 经口服后可以防治结肠炎, 其作用机制是通过介导腺苷-磷酸激活蛋白激酶 (AMPK) 抑制了树突状细胞的激活^[4]; 香菇 EVNs 能通过抑制 NLRP3 炎症小体的活化减轻 D-半乳糖胺/脂多糖诱导的小鼠肝损伤^[5]; 西柚 EVNs 能被肠道巨噬细胞选择性吸收并抑制肠道巨噬细胞产生白细胞介素 1 β (IL-1 β) 和肿瘤坏死因子- α (TNF- α), 从而改善 DSS 诱导的小鼠结肠炎^[6]。综合现有研究报道, 目前 EVNs 的研究对象主要集中在食品领域, 特别是可食用果蔬, 而药源性植物来源 EVNs 的研究鲜见报道。本课题组从 2015 年开始关注药食同源植物及其 EVNs, 优化了 EVNs 的分离方法和储存条件^[7], 探索了不同来源 EVNs 的药理活性^[8], 丰富了人们对药食同源植物及其起效机制的认识。

本文选取 4 种常用的药食同源植物, 鲜姜黄、鲜百合、鲜黄精和鲜天麻, 以其药用部位榨汁分离 EVNs, 考察了其粒径、组成、形貌和稳定性等理化性质, 研究了 EVNs 的抗氧化活性和细胞摄取行为。本研究旨在探索药食同源植物 EVNs 的制备方法和药学性能, 揭示其起效形式, 为阐明中药药效物质基础、促进药食同源植物的开发利用提供参考。

材料与方 法

实验仪器 WJE2802D 榨汁机 (广东美的集团公司); Amicon® Ultra-4 10 kDa 超滤管 (美国 Millipore 公司); Allegra X-15R 贝克曼低速离心机、Optima XP1 超速离心机、Gallios 分析型流式细胞仪 (美国 Beckman Coulter 公司); Nano ZS90 激光粒度仪、Nanosight NS300 纳米颗粒跟踪分析仪 (Nanoparticle Tracking Analysis, NTA) (英国 Malvern 公司); H7650 透射电镜 (日本 Hitachi 公司); TU-1810 紫外可见分光光度计 (北京普析通用仪器有限公司)。

药材与试剂 鲜姜黄 (*Curcuma Longae Rhizoma*, CLR, 购于广东高州姜黄产区, 为姜科植物 *Curcuma longa* L. 的新鲜根茎); 鲜百合 (*Lilii Bulbus*, LB, 购于甘肃兰州百合产区, 为细叶百合 *Lilium Lancifolium* DC. 的新鲜根茎); 鲜黄精 (*Polygonati Rhizoma*, PR, 购于广西桂林黄精产区, 为百合科植物 *Polygonatum sibiricum* Red. 的新鲜根茎); 鲜天麻 (*Gastrodiae Rhizoma*, GR, 购于云南昭通天麻产区, 为兰科植物 *Gastrodia elata* Bl. 的新鲜根茎)。4 种鲜药材均经南京中医药大学中药资源教研室胡杨老师鉴定; 甲醇 (色谱纯)、氯仿 (分析纯) (南京化学试剂有限公司); 磷酸氢二钾、磷酸二氢钾 (上海沪试化工有限公司); 10 \times 磷酸缓冲盐溶液 (PBS)、DMEM 培养基、胎牛血清 (FBS) (南京迈博生物科技有限公司); RIPA 裂解液、细胞膜橙红色荧光染料 DiD (江苏凯基有限公司); Triton X-100 (广州赛国生物科技有限公司); BCA 试剂盒 (上海碧云天生物技术有限公司); 总抗氧化能力检测试剂盒、DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical) 自由基清除试剂盒、羟自由基试剂盒、抑制与产生超氧阴离子自由基测定试剂盒 (南京建成生物工程研究所)。

EVNs 的分离与制备 采用差速离心法分别提取 4 种 EVNs。具体步骤如下: 取鲜中药材, 洗净, 切块后榨汁。将新鲜汁液按照 1:1 (v/v) 加入预冷 1 \times PBS (pH 7.4), 第一步低速 4 000 \times g、4 $^{\circ}$ C 离心 1 h 去除汁液中碎渣, 取上清; 第二步中速 10 000 \times g、4 $^{\circ}$ C 离心 1 h 除去细胞碎片等, 取上清; 第三步将上清在高速 120 000 \times g、4 $^{\circ}$ C 离心 2 h, 弃上清, 沉淀用适量 PBS 分散重悬即得 EVNs。将 4 种新鲜药食同源植物分离得到的相应 EVNs, 依次命名为 CLR-EVNs、LB-EVNs、PR-EVNs 和 GR-EVNs。分别取 4 种 EVNs 1 mL, 加入甲醇 20 mL 混合均匀, 涡旋。氮气保护下于 60 $^{\circ}$ C 蒸去溶剂, 称量干物质量, 以单位质量 (kg) 药材所得 EVNs 干物质量 (mg) 作为收率。

粒径、电位、多分散系数、粒子浓度测定 取 EVNs 适量, 1 \times PBS 稀释至合适浓度, 在 Nano ZS90 自动模式下测定 EVNs 的粒径、多分散系数 (polydispersity index, PDI) 及 zeta 电位。取 EVNs 适量, 1 \times PBS 适当稀释, 在 Nanosight NS300 自动模式下测定各样品粒径和粒子浓度。

透射电镜 (TEM) 测试 取 EVNs 适量, 1 \times PBS 稀释至适宜浓度, 取稀释液 10 μ L 滴于铜网上, 静置 4 min 后用 2% 磷钨酸染色 3 min, 室温干燥。将样品置于透

射电镜 200 kV 电压下成像。

脂质、蛋白质和糖类含量测定 取 EVNs 适量, 加入甲醇-氯仿 (2:1, v/v) 混合溶液涡旋, 加入氯仿和超纯水各 1 mL, 涡旋混匀。22 °C、2 000 r·min⁻¹ 离心 10 min, 取有机层, 在氮气保护下 60 °C 蒸去溶剂, 为 EVNs 总脂质^[9]。取 EVNs 1 mL, 加 RIPA 裂解液 0.5 mL, 涡旋, 冰上静置 15 min, 4 °C、12 000 r·min⁻¹ 离心 15 min 后取上清。利用 BCA 法测定 EVNs 中的蛋白含量^[10]。取 EVNs 1 mL, 加乙醇 20 mL, 超声 30 min, 4 000 r·min⁻¹ 离心 10 min, 沉淀于氮气保护下 60 °C 蒸去溶剂, 即为总糖^[11]。以每 10¹¹ 个 EVNs 粒子中所含脂质、蛋白质和糖类的质量 (mg) 计。

稳定性测试 EVNs 分装, 分别置于 4 °C 和 -80 °C, 于第 3、6、9、12 和 15 天利用 NTA 测定粒径。将 EVNs 在 pH 1.2 (模拟胃液) 和 pH 6.5 (模拟肠液) 中孵育 30 min, 以超纯水中的 EVNs 作为对照, 测定粒径^[12]。

EVNs 结构破坏 利用 Triton X-100 和探头超声分别对 EVNs 结构进行化学和物理破坏。取 EVNs 1 mL, 加入 Triton X-100 1 μL 常温反应 30 min, 进行化学解构。取 EVNs 1 mL 探头超声 (60%, 开 2 s, 关 2 s, 总时间 1 min), 进行物理解构^[13]。

抗氧化能力检测 设置 EVNs 组、超声破坏组和 Triton X-100 破坏组, 分别检测总抗氧化力、抗超氧阴离子自由基能力、抑制羟自由基能力和 DPPH 清除率, 作为评价 EVNs 抗氧化能力的指标, 按照相应试剂盒的说明书操作^[14]。

RAW264.7 对 EVNs 的摄取 RAW264.7 接种于含 10% FBS 的 DMEM 培养基中, 在 37 °C、5% CO₂ 条件下培养。用 DMSO 将 DiD 制成浓度为 5 mmol·L⁻¹ 的储备液, 向新制备 EVNs 和结构破坏的 EVNs 中分别加入 DiD 储备液至终浓度为 5 μmol·L⁻¹, 37 °C 避光孵育 30 min, 然后通过 10 kDa 超滤管, 4 °C、3 500 r·min⁻¹ 离心 10 min 去除游离染料, 得到标记的 DiD-EVNs^[12]。取 DiD-EVNs 1 mL 加入至已接种 RAW264.7 细胞 (ATCC) 的 12 孔板内, 37 °C、5% CO₂ 培养 1 h, 弃上清, 加入 PBS 洗涤 2 次后, 细胞再次重悬于 1×PBS。细胞悬液过 300 目细胞筛至 5 mL 流式管内, 采用流式细胞仪分析^[12]。

统计学分析 实验数据采用平均值 ± 标准差表示, 以 GraphPad Prism 8 软件进行统计学分析, 组间比较采用单因素方差分析, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

结果

1 EVNs 的制备与表征

差速离心法是细胞外囊泡分离的“金标准”^[15], 前期实验已证实该法适用于鲜药 EVNs 的制备。按此法

制备的 CLR-EVNs、LB-EVNs、PR-EVNs 和 GR-EVNs 收率 (干重计) 分别为 1 242 ± 39、873 ± 41、1 716 ± 20 和 148.2 ± 23 mg·kg⁻¹。此前, Wang 等^[16]曾报道使用差速离心法分离生姜、葡萄、西柚和西红柿的产率分别为 48、1 760、2 200 和 400 mg·kg⁻¹。因此, 本文制备的药食同源 EVNs 的收率在合理范围内。

借助激光粒度仪监测分离过程各环节样品的粒径, 发现经过差速离心可以去除鲜药汁中的细胞和细胞碎片等微粒, 得到较纯净的 EVNs。4 种 EVNs 的分离情况和理化性质如图 1 和表 1 所示。测试结果显示, 纯化后的 EVNs 粒径分布曲线对称性较好; PDI 均小于 0.2, 说明 EVNs 粒径分布较均匀; 不同 EVNs 的 zeta 电位不同, 但均呈负电荷, 主要集中于 -20 ~ -10 mV 内。NTA 结果表明, EVNs 粒径集中在 150~200 nm 之间, 每毫升的粒子数均达到 10¹¹。

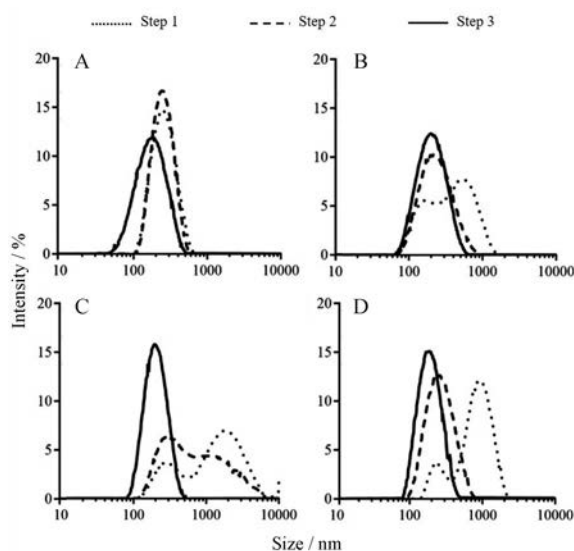


Figure 1 Size distribution of extracellular vesicle-like nanoparticles (EVNs) after different separation steps determined by Nano ZS90. A: CLR-EVNs; B: LB-EVNs; C: PR-EVNs; D: GR-EVNs. Step 1, Step 2, or Step 3 represents the sample obtained in each step. CLR: *Curcumae Longae Rhizoma*; LB: *Lilii Bulbus*; PR: *Polygonati Rhizoma*; GR: *Gastrodiae Rhizoma*

Table 1 Physical and chemical characterization of EVNs. Size and concentration were obtained from nanoparticle tracking analysis (NTA), polydispersity index (PDI), and zeta potentials were measured by Nano ZS90. $n = 3, \bar{x} \pm s$

Sample	Size/nm	Concentration /10 ¹¹ ·mL ⁻¹	PDI	Zeta/mV
CLR-EVNs	172.3 ± 0.3	0.85 ± 0.01	0.18 ± 0.04	-13.3 ± 0.2
LB-EVNs	172.5 ± 4.1	2.43 ± 0.11	0.17 ± 0.04	-18.8 ± 0.2
PR-EVNs	180.2 ± 0.6	1.51 ± 0.01	0.18 ± 0.04	-11.3 ± 0.4
GR-EVNs	157.8 ± 1.1	3.31 ± 0.10	0.10 ± 0.03	-21.7 ± 0.3

利用 TEM 对 EVNs 形貌进行表征, 结果如图 2 所示。4 种 EVNs 样品均含有大量纳米级颗粒, 粒径在 150~200 nm 之间, 多数纳米粒呈现细胞外囊泡经典的茶托样结构。综合上述测试结果, 证明采用超速离心方法能够实现对不同药源植物 EVNs 的分离和富集, 而且粒径和形态均与可食用植物囊泡的特征基本一致。

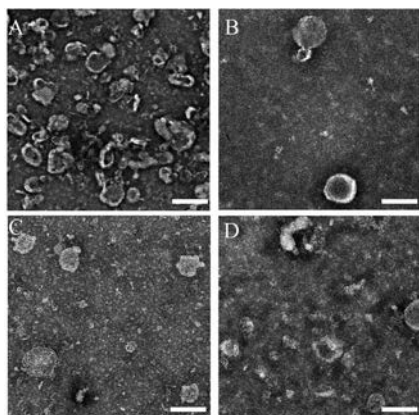


Figure 2 The morphology of EVNs determined by transmission electron microscopy (TEM). A: CLR-EVNs; B: LB-EVNs; C: PR-EVNs; D: GR-EVNs. The scale bars were 200 nm

2 组成分析

EVNs 的脂质、蛋白和糖类成分的含量测定结果如表 2 所示, 不同来源 EVNs 的成分组成存在明显差异, 体现出不同鲜药 EVNs 的种源差异。

Table 2 Lipid, protein, and sugar contents of 10¹¹ EVNs

Sample	Lipid/mg	Protein/mg	Sugar/mg
CLR-EVNs	0.94	0.87	0.35
LB-EVNs	0.49	0.40	0.21
PR-EVNs	0.79	1.29	0.46
GR-EVNs	0.12	0.51	7.98

3 稳定性考察

3.1 不同温度下的稳定性 据文献报道, 哺乳动物来源 EVNs 在 4 °C 可保存约 2 周, 而在 -80 °C 可保存更长时间。如骨髓间充质干细胞 EVNs 在 -80 °C 可保存长达 6 个月^[17]; 牛奶 EVNs 在 -80 °C 保存 4 周后, 物理性质未发生明显改变^[18]。但植物来源 EVNs 在不同贮存温

度下的稳定性尚缺报道。作者利用 NTA 监测 4 种 EVNs 在 4 °C 和 -80 °C 环境存放过程中的粒径变化, 结果如图 3 所示。在 4 °C 条件下, 只有 CLR-EVNs 的粒径未见明显变化, 其余 3 种 EVNs 随储存时间延长, 粒径出现不同程度的增加, 表明可能有聚集现象。在 -80 °C 环境下, 4 种 EVNs 放置 15 天粒径均未发生明显变化, 表明 EVNs 在 -80 °C 条件下储存较稳定。

3.2 不同 pH 值下的稳定性 为了评价 EVNs 在胃肠液中的稳定性, 分别配制 pH 1.2 和 6.5 的模拟胃液和肠液, 测定 EVNs 在上述条件下的粒径变化。结果如图 4 所示, CLR-EVNs 在水、pH 1.2 和 pH 6.5 三种环境下均有较好的稳定性, 粒径基本未发生变化, 其余 3 种 EVNs 在 pH 1.2 溶液中粒径有不同程度的增加; 在 pH 6.5 下, 仅 GR-EVNs 的粒径有轻微增加。

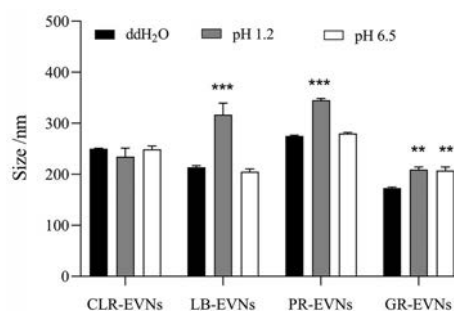


Figure 4 Average size of CLR-EVNs, LB-EVNs, PR-EVNs, and GR-EVNs treated by ddH₂O, pH 1.2 solution (stomach-like solution), and pH 6.5 solution (intestinal-like solution) determined by NTA. $n = 3, \bar{x} \pm s$. ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ vs ddH₂O group

4 EVNs 抗氧化活性分析

4.1 总抗氧化能力 2,2'-联氮-双-3-乙基苯并噻唑啉-6-磺酸 [2,2'-azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid), ABTS] 在氧化剂作用下会氧化成绿色 ABTS⁺, 当存在抗氧化物时, 就会抑制 ABTS⁺ 的产生。本实验以 Trolox (维生素 E 类似物) 作为基准, 以 EVNs 相对 Trolox 的比值反映抗氧化能力。结果如图 5A 所示, 4 种不同药源植物 EVNs 的总抗氧化能力不同, 其中以 LB-EVNs 的总抗氧化能力最优, 与 Trolox 相当。超声处理 EVNs 后, 总抗氧化能力均出现不同程度下降, 其中

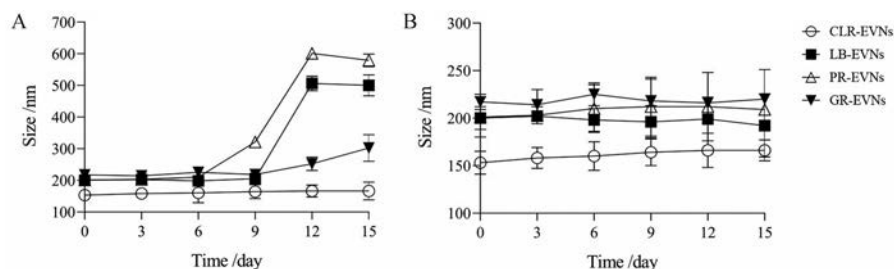


Figure 3 Particle size changes of four EVNs determined by NTA. A: EVNs are stored at 4 °C; B: EVNs are stored at -80 °C. $n = 3, \bar{x} \pm s$

LB-EVNs 和 GR-EVNs 最为明显,前者下降 23.3%,后者下降 40.8%。4 种 EVNs 被 Triton X-100 处理后,总抗氧化能力也明显下降,PR-EVNs、LB-EVNs、GR-EVNs 和 CLR-EVNs 分别下降 55.0%、20.1%、41.4% 和 40.7%。

4.2 DPPH 清除率 DPPH 自由基在 517 nm 处有强吸收,醇溶液呈紫色。当存在自由基清除剂时,与 DPPH 单电子配对致使其吸收消失。如图 5B 所示,4 种 EVNs 均具有清除 DPPH 自由基的能力。超声破坏使得 CLR-EVNs 清除能力下降 11.5%,而对其他 3 种 EVNs 清除 DPPH 的能力影响不明显。GR-EVNs 和 LB-EVNs 被 Triton X-100 破坏后,对 DPPH 的清除能力显著下降,分别下降 36.8% 和 23.1%。

4.3 抑制超氧阴离子能力 黄嘌呤和黄嘌呤氧化酶反应会产生超氧阴离子自由基,加入显色剂可使体系呈紫红色。当抗氧化物加入时,紫红色变浅。通过比色法可以判断形成物的颜色深浅,从而计算出抑制超氧阴离子的能力。EVNs 抑制超氧阴离子能力如图 5C 所示,其中 LB-EVNs 抑制作用最佳。当 EVNs 被超声解构后,其抑制超氧阴离子能力略有下降,但并不明显。Triton X-100 处理后,PR-EVNs、LB-EVNs、GR-EVNs 和 CLR-EVNs 抑制超氧阴离子的能力显著下降,分别下降 8.1%、6.3%、12.3% 和 12.7%。

4.4 抑制羟自由基活力 H_2O_2/Fe^{2+} 通过 Fenton 反应产生羟自由基,并将 Fe^{2+} 氧化为 Fe^{3+} , 导致 536 nm 吸光度降低。体系在 536 nm 吸光度降低时的抑制率可以反映 EVNs 的羟自由基清除能力。如图 5D 所示, LB-EVNs 清除羟自由基的能力最强,当经过超声或者

Triton X-100 处理后,活性显著降低,分别下降 16.5% 和 28.7%; GR-EVNs 经 Triton X-100 处理后抗氧化活性下降 18.3%; PR-EVNs 和 CLR-EVNs 经物理或化学结构处理后,活性未见明显变化。

综合上述实验结果, LB-EVNs 在 4 种 EVNs 中抗氧化能力最强。当采用物理或化学解构方法处理后,均不同程度地减弱了 EVNs 的抗氧化能力,提示 EVNs 的结构完整性与其抗氧化活性有较大的关联。

5 RAW264.7 对 EVNs 的摄取

为了进一步评价 4 种 EVNs 性能之间的区别,选择 RAW264.7 考察 4 种 EVNs 的摄取情况。如图 6A、B 所示,4 种 EVNs 均能被 RAW264.7 摄取,其中 CLR-EVNs 的摄取量最多,PR-EVNs 的摄取最少。

为了论证 EVNs 结构和性能之间的关系,分别利用探头超声和 Triton X-100 对 EVNs 进行结构破坏,并通过流式细胞术分析 RAW264.7 细胞对结构破坏前后 EVNs 的摄取变化。实验过程中发现,破坏 EVNs 所需 Triton X-100 的浓度为 0.1% (v/v),而该条件可造成 RAW264.7 细胞大量死亡,于是后续实验未采用 Triton X-100 破坏 EVNs。结果如图 7 所示,RAW264.7 对超声破坏后的 EVNs 摄取显著降低,证明超声处理对 EVNs 的细胞摄取有较大影响,进一步反映 EVNs 结构与其转运性能可能存在一定的关联性。

讨论

植物来源囊泡样纳米粒是借鉴细胞外囊泡的分离方法从新鲜采集的植物榨汁液中分离到的一类纳米结

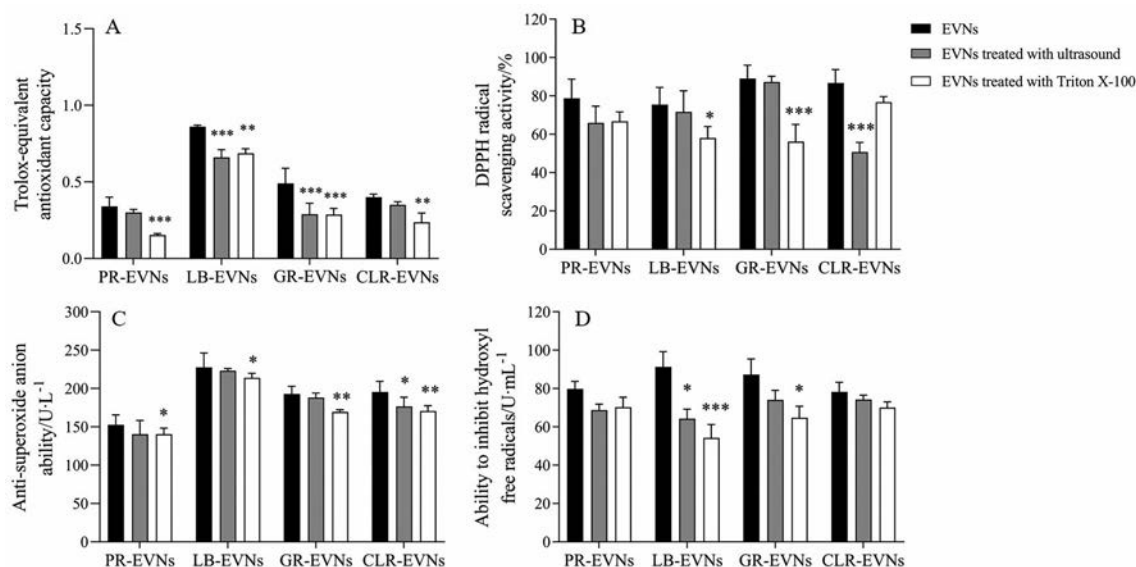


Figure 5 Antioxidant activities of EVNs. A: Antioxidant effects of EVNs and structurally damaged EVNs. Total antioxidant capacity of EVNs; B: 1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl radical (DPPH) radical scavenging activity of EVNs; C: Anti-superoxide anion ability of EVNs; D: Ability of EVNs to inhibit hydroxyl free radicals. $n = 3$, $\bar{x} \pm s$. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ vs EVNs group

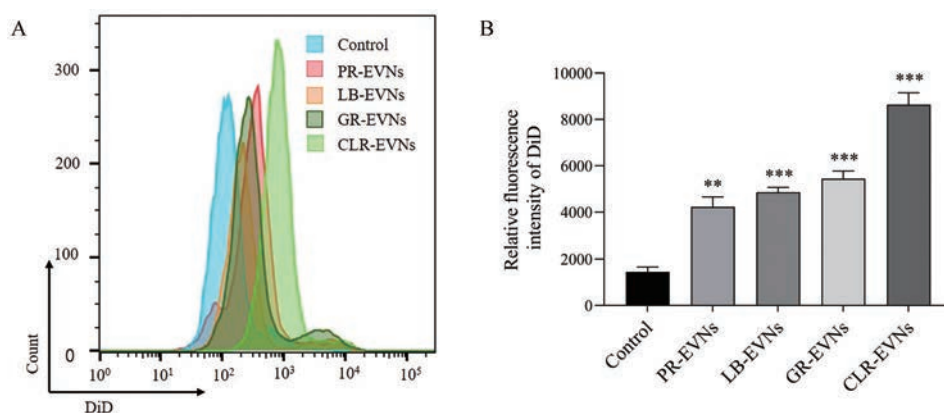


Figure 6 The uptake of EVNs by RAW264.7. A: Uptake of DiD-labeled EVNs detected by flow cytometry. Intracellular fluorescence intensity after treated with four DiD-labeled EVNs; B: Quantification of cellular uptake after incubation with four DiD-labeled EVNs. $n = 3$, $\bar{x} \pm s$. ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ vs control group

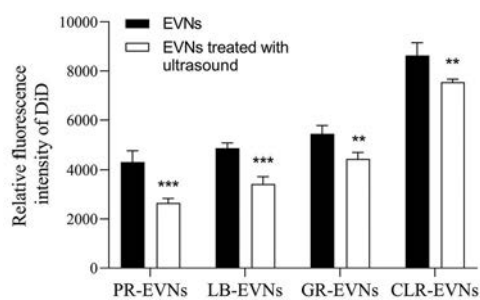


Figure 7 Uptake of DiD-labeled EVNs and structurally damaged EVNs treated with ultrasonic probe were detected by flow cytometry. $n = 3$, $\bar{x} \pm s$. ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ vs EVNs group

构。由于其提取过程未区分植物微观结构, 因此所得 EVNs 的生源较复杂, 不适合作为植物生理学的研究对象。但是, 由于植物资源广泛、分离收率较高、操作简便, 且 EVNs 表现出明显的药理活性和作为药物载体的潜力而适用于植物深加工或其他生物医学应用领域^[19-21]。对药源性植物来说, EVNs 制备过程未使用有机溶剂和破坏性分离方法, 较好地体现了原生中药多成分、多途径起效的特点, 且结构和功能独立, 便于监测和评价。同时由于脂质、蛋白等初级代谢产物的存在以及纳米化的尺度, 常有助于解决中药单体化合物溶解性、渗透性等生物利用度问题, 适宜作为中药整体药效物质形式开展相关研究^[22-24]。

本文选择 4 种药食同源植物的新鲜药用部位, 采用差速离心法分离获得 EVNs, 并利用粒度仪、NTA 和 TEM 等技术对其进行表征, 证明了 EVNs 的普遍存在; 评价不同储存温度和 pH 环境对 EVNs 粒径的影响, 显示不同来源 EVNs 可能具有不同的稳定性。事实上, 在实验中发现部分 EVNs 在不同 pH 条件下孵育 30 min 即出现粒径改变。由于 EVNs 成分中包含脂质、蛋白

等两性分子, 其粒度、电荷、结构可能受 pH 等因素影响较大, 单纯依赖粒径结果尚不足以判定 EVNs 的稳定性, 因此没有再延长测试时间。此外, 单纯评价粒度和形态不能支持环境因素对 EVNs 活性的影响, 有必要增加相关活性检测; 若想考察胃肠道真实条件对 EVNs 的影响, 还需开展更为深入的体内转运研究, 但目前上述研究都比较缺乏。与动物来源胞外囊泡类似, 植物 EVNs 源于鲜榨汁液提取物, 其稳定性和保存方法的确是制约其产业化应用的关键技术问题。作者前期对此开展了一些探索, 表明冻干处理可能是一种有效的保存方式^[7]。本文的研究亮点之一是通过抗氧化和细胞摄取实验证明 EVNs 的活性和跨膜能力与自身结构有较大关联, 提示中药多成分起效的协作关系。

长期以来, 以中药化学为基础的中药研究为揭示中药活性化学成分奠定了坚实基础, 而决定中药起效的另一关键因素, 即化学成分相互作用形成的物理结构及其与药效的关联性亟待被揭示^[22]。这既是阐明包括鲜药在内的中药功效物质基础的需要, 也是开发药食同源产品、提高中药资源利用率的有效途径。

作者贡献: 李思敏负责部分实验设计与实施、统计分析结果和撰写论文; 何凤军负责部分实验实施和统计分析结果; 秦琳茜和杨凯宇负责部分实验实施; 乔宏志负责研究思路的提出、实验设计与修订论文。

利益冲突: 本文所有作者均声明不存在利益冲突。

References

- [1] Zhao M, Li SM, Zhang L, et al. Research progress of plant-derived vesicles and their biomedical applications [J]. Acta Pharm Sin (药学报), 2020. DOI: 10.16438/j.0513-4870.2020-1514.
- [2] 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.
- [3] Dad HA, Gu TW, Zhu AQ, et al. Plant exosome-like nanovesicles: emerging therapeutics and drug delivery nanoplatforms [J]. *Mol Ther*, 2021, 29: 13-31.
- [4] Deng Z, Rong Y, Teng Y, et al. Broccoli-derived nanoparticle inhibits mouse colitis by activating dendritic cell AMP-activated protein kinase [J]. *Mol Ther*, 2017, 25: 1641-1654.
- [5] Liu B, Lu Y, Chen X, et al. Protective role of shiitake mushroom-derived exosome-like nanoparticles in *D*-galactosamine and lipopolysaccharide-induced acute liver injury in mice [J]. *Nutrients*, 2020, 12: 477.
- [6] 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.
- [7] Qiao HZ, Li SM, Lv Q. Preparation and application of plant-derived exosomes-like products: CN, 112451488A [P/OL]. 2021-03-09.
- [8] Zhang L, He F, Gao L, et al. Engineering exosome-like nanovesicles derived from asparagus cochinchinensis can inhibit the proliferation of hepatocellular carcinoma cells with better safety profile [J]. *Int J Nanomedicine*, 2021, 16: 1575-1586.
- [9] Liu NJ, Wang N, Bao JJ, et al. Lipidomic analysis reveals the importance of GIPCs in arabidopsis leaf extracellular vesicles [J]. *Mol Plant*, 2020, 13: 1523-1532.
- [10] Rutter B D, Innes RW. Extracellular vesicles isolated from the leaf apoplast carry stress-response proteins [J]. *Plant Physiol*, 2017, 173: 728-741.
- [11] Wang C, Su JY, Cai JY, et al. Response surface analysis for the optimization of extraction condition for polysaccharides from *Epimedium* polysaccharides and studies on its tumor immune activities [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2016, 51: 1464-1471.
- [12] Chen QB. The Study of Tea Flower-derived Lipid Nanovesicles in the Treatment of Breast Cancer (茶树花衍生纳米囊泡在乳腺癌治疗中的研究) [D]. Chongqing: Southwest University, 2019.
- [13] Cao M, Yan H, Han X, et al. Ginseng-derived nanoparticles alter macrophage polarization to inhibit melanoma growth [J]. *J Immunother Cancer*, 2019, 7: 326.
- [14] Chen C, Lin BB, Xu YM, et al. Analysis of active components and antioxidant activity of aqueous extract of *Gastrodia elata* [J]. *Sci Technol Food Ind (食品工业科技)*, 2019, 40: 17-22.
- [15] Li P, Kaslan M, Lee SH, et al. Progress in exosome isolation techniques [J]. *Theranostics*, 2017, 7: 789-804.
- [16] Wang Q, Zhuang X, Mu J, et al. Delivery of therapeutic agents by nanoparticles made of grapefruit-derived lipids [J]. *Nat Commun*, 2013, 4: 1867.
- [17] Mendt M, Kamerkar S, Sugimoto H, et al. Generation and testing of clinical-grade exosomes for pancreatic cancer [J]. *JCI Insight*, 2018, 3: e99263.
- [18] Zonneveld MI, Brisson AR, van Herwijnen MJ, et al. Recovery of extracellular vesicles from human breast milk is influenced by sample collection and vesicle isolation procedures [J]. *J Extracell Vesicles*, 2014, 3: 24215.
- [19] Liu S, da Cunha AP, Rezende RM, et al. The host shapes the gut microbiota *via* fecal microRNA [J]. *Cell Host Microbe*, 2016, 19: 32-43.
- [20] Wang Q, Zhuang X, Mu J, et al. Delivery of therapeutic agents by nanoparticles made of grapefruit-derived lipids [J]. *Nat Commun*, 2013, 4: 1867.
- [21] Zhang M, Viennois E, Xu C, et al. Plant derived edible nanoparticles as a new therapeutic approach against diseases [J]. *Tissue Barriers*, 2016, 4: e1134415.
- [22] Qiao HZ, Di LQ, Ping QN, et al. Structural Chinese medicine: a new research field on the pharmacodynamic substance basis of traditional Chinese medicine [J]. *China J Chin Mater Med (中国中药杂志)*, 2021. DOI: 10.19540/j.cnki.cjcmm.20210129.20210601.
- [23] Sundaram K, Miller DP, Kumar A, et al. Plant-derived exosomal nanoparticles inhibit pathogenicity of porphyromonas gingivalis [J]. *iScience*, 2020, 23: 100869.
- [24] Chen X, Zhou Y, Yu J. Exosome-like nanoparticles from *Ginger Rhizomes* inhibited NLRP3 inflammasome activation [J]. *Mol Pharm*, 2019, 16: 2690-2699.