

## 食物来源外泌体口服制剂的医学应用

宋俊彦<sup>1</sup>, 赵 凯<sup>2</sup>, 何文秀<sup>1</sup>, 栾玉霞<sup>1</sup>, 纪建波<sup>1</sup>

(1 山东大学药学院, 济南 250012; 2 山东杰凯生物科技有限公司, 济南 250101)

**[摘要]** 相比于静脉注射等其他给药方式,口服给药简单易行、医疗成本低且安全性高,可减轻患者痛苦,增强人文关怀。然而由于胃肠道环境恶劣,许多口服药物无法以有效治疗浓度到达靶部位,发挥治疗作用,开发口服制剂面临许多挑战。外泌体是一种由细胞分泌的囊泡,通过运输蛋白质、核酸、miRNA等生物活性物质作用于受体细胞,进行细胞间通讯。最近研究者发现,从蔬菜、水果、乳制品中也可提取出类似于哺乳动物细胞分泌的外泌体结构的物质,将其命名为食物来源外泌体(food-derived exosomes, FDEs),这类外泌体凭借低免疫原性、高生物相容性、无毒环保等优势引起了广泛关注。本文总结了从食物中提取的外泌体作为口服制剂在医学中的应用,希望为基于FDEs的口服制剂开发及应用提供理论参考。

**[关键词]** 食物来源外泌体;口服制剂;医学应用

**[中图分类号]** R945 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1003-3734(2023)16-1636-08

### Medical application of oral preparations based on food-derived exosomes

SONG Jun-yan<sup>1</sup>, ZHAO Kai<sup>2</sup>, HE Wen-xiu<sup>1</sup>, LUAN Yu-xia<sup>1</sup>, JI Jian-bo<sup>1</sup>

(1 School of Pharmacy, Shandong University, Jinan 250012, China; 2 Shandong Jiekai Biotechnology Co., Ltd., Jinan 250101, China)

**[Abstract]** Compared with other administration methods such as intravenous injection, oral administration is simple and feasible with low medical cost and high safety, and can relieve the pain of patients and enhance humanistic care. However, due to the harsh gastrointestinal environment, many oral drugs cannot reach their target sites with effective concentrations to exert therapeutic effects. Therefore, there are many challenges in developing oral drugs. Exosomes are extracellular vesicles secreted by cells, which transport proteins, nucleic acids, miRNA and other bioactive substances to receptor cells for intercellular communication. Recently, a number of researchers have reported that vesicles with structures similar to those secreted by mammalian cells can be extracted from vegetables, fruits and dairy products, and named them as food-derived exosomes (FDEs). FDEs have attracted wide attention due to their low immunogenicity, high biocompatibility, non-toxic and environmental properties. This review summarizes the medical application of FDEs as oral preparations, hoping to provide theoretical reference for the development and application of oral preparations based on FDEs.

**[Key words]** food-derived exosomes; oral formulation; medical application

**[基金项目]** 国家自然科学基金面上项目(82061148009;21872083)

**[作者简介]** 宋俊彦,女,硕士研究生,研究方向:纳米药物与肿瘤治疗。E-mail:1552287703@qq.com。

**[通讯作者]** 纪建波,女,实验师,研究方向:新药药理。E-mail:jjjianbo@sdu.edu.cn。

口服给药简便易行、安全性高,可减轻患者痛苦,提高患者的生活质量,增强人文关怀<sup>[1-2]</sup>,相比于其他给药方式,患者更易接受口服给药。然而对于一些恶性疾病或慢性疾病,药物通过口服疗效欠佳,往往采用其他给药方式。例如:对癌症患者来说,化疗、放疗及外科手术切除肿瘤是目前常采用的治疗措施,化疗药物一般通过静脉途径给药,但是静脉给药往往会带来严重的不良反应,患者需要住院护理和治疗,医疗成本较高。口服给药能够克服静脉注射引起局部疼痛和产生不良反应的局限性,引起了人们的广泛关注。药物在胃肠道的降解以及小肠上皮细胞的低渗透性等因素,导致口服给药的生物利用度低,再加上原料药性质的多样化、辅料的不确定性、人体生理屏障的存在等都为口服制剂的开发带来困难。因此,如何合理设计口服制剂、减少药物不良反应并提高生物利用度,是药物口服递送的一大挑战<sup>[3-4]</sup>。

外泌体是由各种细胞主动分泌的磷脂囊泡,主要通过胞吐过程释放至细胞外,在细胞和生物体之间传递信息。外泌体含有与母体细胞相同的物质,可携带具有无害特性的化学物质进入生物环境,执行多种功能<sup>[5]</sup>。外泌体最初被认定为“细胞灰尘”或充当细胞处理自身废物的物质,后来研究者发现外泌体是参与细胞通讯的重要介质,可在细胞间运输蛋白质、核酸、miRNA 等物质,调节受体细胞的生物活性,维持组织稳态<sup>[6]</sup>。外泌体为脂质双分子层结构,主要成分为磷脂,与细胞膜组成相似,具有良好的生物相容性、高渗透性、较好的稳定性,尺寸约为 40 ~ 150 nm,可作为理想的药物递送载体<sup>[7]</sup>。

哺乳动物细胞来源的外泌体携带有母体细胞的各种特性,可传递信息给受体细胞,介导细胞间通讯。但是在其作为药物载体的开发过程中也存在许多挑战,例如:外泌体装载的外源性药物是否会影响内源性物质的表达或者与内源性物质发生相互作用、如何选择安全的细胞来源外泌体以避免免疫原性问题以及如何实现高产量的外泌体分离等。食物来源外泌体(food-derived exosomes, FDEs)是指由细胞分泌的具有膜结构的囊泡,主要用于细胞间的信息交流,抵御病原体的攻击。FDEs 富含具有生物活性的脂质、蛋白质、RNA 和其他药理活性分子,其独特的形态和生物组成使其成为天然的纳米载体,FDEs 已经被证实在几种疾病模型中具有疗效,并被

用于新型药物的开发。近几年,FDEs 逐渐被应用于靶向药物递送研究<sup>[8]</sup>。

FDEs 是近几年被广泛报道的可用于疾病治疗或者作为药物载体的纳米囊泡,已从葡萄柚<sup>[9]</sup>、牛奶<sup>[10]</sup>、生姜<sup>[11]</sup>等食物中提取获得。与传统的药物载体如脂质体或人工合成的纳米粒相比,这些从食物中提取的外泌体具有免疫原性低、无毒、环保、生物相容性好、可跨越血脑屏障而不透过胎盘屏障、可实现大规模生产等优势,因此作为药物载体用于疾病治疗具有非常广阔的前景<sup>[12]</sup>。由于不同食物来源的外泌体脂质成分不同,它们用于机体后,可靶向不同的组织。例如:葡萄柚来源的外泌体可靶向肠道巨噬细胞<sup>[13]</sup>、葡萄来源的外泌体可靶向肠道干细胞<sup>[14]</sup>、西蓝花来源的外泌体可靶向树突状细胞(dendritic cells, DCs)<sup>[15]</sup>、柠檬来源的外泌体可靶向肿瘤细胞<sup>[16]</sup>等。利用不同 FDEs 的靶向特性差异,可将其用于不同疾病的治疗,见图 1。FDEs 被肠道吸收后可通过血液循环转运至特定器官,通过与受体细胞相互作用,调节机体稳态,产生特定的治疗和保护作用。因此总结口服 FDEs 在医学中的应用具有重要意义,然而目前还未见相关报道。

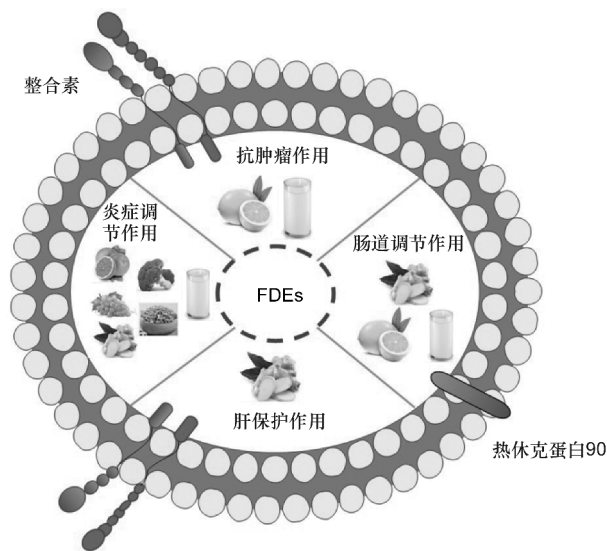


图 1 食物来源外泌体的治疗作用

本研究以治疗作用分类,主要总结了从柠檬、牛奶、葡萄柚、葡萄、生姜、西蓝花、燕麦等食物中提取的外泌体的靶向特性、对疾病的治疗作用及作用机制(见表 1),期望为开发基于 FDEs 的口服制剂提供理论参考。

表 1 食物来源外泌体的作用机制

治疗作用	外泌体来源	作用机制	参考文献
抗肿瘤作用	柠檬	抑制脂质代谢	[17]
	牛奶	未提及	[18]
炎症治疗作用	葡萄柚	靶向肠道巨噬细胞	[13]
	葡萄	促进肠道干细胞的增殖	[14]
	生姜	靶向结肠部位	[19]
	西蓝花	增强腺苷酸激活蛋白激酶(AMPK)的信号传导	[15]
	燕麦	阻止酒精诱导的脑部炎症通路的激活	[20]
	牛奶	确切治疗机制有待确定	[21]
	肠道调节作用	生姜	改变肠道微生物群的组成
肝保护作用	柠檬	改善肠道菌群	[23]
	牛奶	调节肠道微生物群	[24]
	生姜	增加核转录相关因子 2(Nrf2)核转位	[25]

## 1 口服外泌体的医学应用

### 1.1 抗肿瘤作用

癌症是导致我国人口死亡的主要病因之一,给公共卫生系统带来了巨大挑战<sup>[26-27]</sup>。随着社会的不断发展,人口老龄化和不健康的生活方式导致癌症患者大幅增多,因此,开发高效抗肿瘤的药品迫在眉睫。

据报道,柑橘类等水果的水提取物或其本身含有的化学物质对肿瘤具有抑制作用<sup>[28]</sup>。柠檬作为柑橘类的代表性水果,其外泌体可靶向肿瘤细胞,发挥抗肿瘤作用。由于柠檬和胃内的 pH 相似,所以柠檬外泌体在胃肠道内具有良好的稳定性。Yang 等<sup>[29]</sup>发现给小鼠灌胃柠檬外泌体后,可有效抑制胃内肿瘤的生长,且安全性良好,对肝脏、肾脏、脾脏等无不良反应,其抗肿瘤效果与活性氧的产量呈正相关。为了深入了解柠檬外泌体对结肠癌细胞的作用机制,Raimondo 等<sup>[17]</sup>用柠檬外泌体处理结肠癌细胞后,进行蛋白质组学分析,发现乙酰辅酶 A 羧化酶 1 (acetyl-CoA carboxylase 1, ACACA) 的表达显著下调。ACACA 是参与脂肪酸合成的限速酶,可将乙酰辅酶 A 催化生成丙二酰辅酶 A。沉默 ACACA 可以抑制结肠癌细胞增殖,说明柠檬外泌体的抗肿瘤作用部分是由抑制脂质代谢介导的。

牛奶作为日常生活中一种补充能量的天然饮料,可为人体提供蛋白质、脂质、维生素、乳糖等丰富的营养物质<sup>[30]</sup>。牛奶外泌体在胃肠道中可保持稳定,不被降解,其表面含有膜蛋白和转运蛋白,具有良好的生物相容性和较高的细胞摄取效率,在血液中可长效循环<sup>[31]</sup>。此外,从牛奶中分离的外泌体产

量较大,1 L 牛奶大约可分离出 200 mg 蛋白量的外泌体<sup>[21]</sup>。因此,牛奶外泌体作为口服药物载体以及在实现大规模生产方面很有潜力。

牛奶外泌体在肿瘤发展和转移中发挥着重要作用。其在恶劣的胃肠道环境中可保持稳定<sup>[32]</sup>,口服后可稳定通过胃肠道,被小肠上皮细胞吸收进入血液循环,到达肝脏等各个器官,实现跨物种交流。Samuel 等<sup>[18]</sup>研究了牛奶外泌体的抗肿瘤作用,构建小鼠皮下结肠癌肿瘤模型,以 25 mg·kg<sup>-1</sup> 的剂量灌胃后,牛奶外泌体可特异性到达肿瘤部位,抑制肿瘤生长。此外,为研究牛奶外泌体在不同肿瘤模型中的作用,构建了小鼠乳腺癌肿瘤模型。给小鼠口服磷酸盐缓冲液(PBS)、牛奶中提取的外泌体(CM EVs)、全脂牛奶(WM)、不含外泌体的牛奶(EV dep milk),发现 CM EVs 和 WM 能够抑制原发肿瘤的发展,而 EV dep milk 几乎没有治疗作用。在研究牛奶外泌体对肿瘤转移的作用时,发现小鼠以 25 mg·kg<sup>-1</sup> 的剂量口服牛奶外泌体加速了乳腺癌和胰腺癌的转移。而小鼠口服 5 μg 的牛奶外泌体仍可抑制原发性肿瘤的生长,不能显著加速转移。以上结果说明牛奶外泌体的给药时机很重要,在切除原发肿瘤后再口服牛奶外泌体,可逆转其促进肿瘤转移的不利作用。此研究说明了牛奶外泌体在跨物种交流以及调节肿瘤发展和转移中的作用。

牛奶外泌体与脂质体结构类似,由磷脂双分子层构成,因此也可用作药物载体<sup>[33]</sup>。与脂质体相比,牛奶外泌体具有在体内更稳定、循环时间更长、生物相容性更好、靶向性更好等独特优势。化疗药物紫杉醇(paclitaxel, PTX)具有水溶性差、生物利用

度低等缺点<sup>[34]</sup>,Agrawal 等<sup>[35]</sup>利用牛奶外泌体作为药物载体包裹 PTX。发现负载 PTX 的牛奶外泌体不仅在体外模拟胃肠溶液中稳定性良好,而且口服后可显著抑制小鼠肿瘤生长。与静脉注射 PTX 溶液相比,口服负载 PTX 的牛奶外泌体具有更低的全身毒性和免疫毒性。Munagala 等<sup>[36]</sup>用牛奶外泌体包载花青素,研究其对小鼠肺肿瘤的作用,发现小鼠口服牛奶外泌体后可显著抑制肿瘤生长,提高了花青素的口服生物利用度,且无明显毒副作用。此外,他们还证明与游离花青素相比,负载花青素的牛奶外泌体对耐药卵巢癌细胞的抗增殖活性显著提高<sup>[37]</sup>。在耐药卵巢癌肿瘤模型中,联用负载花青素的牛奶外泌体和负载 PTX 的牛奶外泌体使肿瘤体积明显减小,抗肿瘤活性显著增强。以上结果均说明牛奶外泌体可作为抗肿瘤药物良好的口服载体。

## 1.2 炎症治疗作用

除了肿瘤,FDEs 对炎症也具有治疗作用,这里我们主要介绍 FDEs 对炎症性肠病(inflammatory bowel disease,IBD)、脑部炎症和关节炎的治疗作用。

### 1.2.1 治疗 IBD

IBD 包括溃疡性结肠炎和克罗恩病,是一种慢性炎症性疾病。目前对于 IBD 还无有效的治疗方法,更糟糕的是,IBD 很可能发展为更难治愈的结肠炎相关的结肠癌<sup>[38]</sup>。IBD 的现有疗法主要是服用抗炎药物,但是长期使用会导致很多不良反应,如胃肠道反应、肝肾功能损害等。从葡萄柚、生姜、西蓝花等食物中提取的外泌体可特异性靶向炎症部位并滞留较长时间,用于治疗溃疡性结肠炎具有显著优势。

葡萄柚外泌体和葡萄外泌体可靶向肠道细胞,调节肠道稳态,在用作个性化口服药物递送载体方面非常有潜力,可用于开发治疗炎症的口服小分子药物。Wang 等<sup>[13]</sup>研究发现葡萄柚外泌体本身具有抗炎作用,且可以作为口服药物载体递送抗炎药物。葡萄柚外泌体具有良好的生物相容性,可以靶向肠道巨噬细胞,诱导抗氧化因子血红素加氧酶-1 表达,抑制促炎因子的产生,增强宿主的抗炎能力。葡萄柚外泌体预处理可改善葡聚糖硫酸钠(dextran sulfate sodium,DSS)诱导的结肠炎。与 PBS 组相比,葡萄柚外泌体预处理结肠炎小鼠后,可减轻结肠炎小鼠引起的体重减轻和结肠缩短,组织学分析显示炎症程度减弱,对上皮损伤和炎症浸润的组织学评分降低以及 E-钙黏蛋白的表达显著提高,E-钙黏蛋白的表达受损与肠道屏障功能和免疫平衡紊乱有

关。另外利用葡萄柚外泌体作为载体递送抗炎药物甲氨蝶呤(methotrex-ate,MTX),可显著降低 MTX 的毒性,将药物靶向递送至小鼠肠道,被肠道巨噬细胞选择性吸收,减轻 DSS 诱导的结肠炎。Ju 等<sup>[14]</sup>报道了葡萄外泌体可透过肠道黏液屏障,靶向肠道干细胞,并被肠道干细胞摄取,显著促进肠道干细胞的增殖。其用于治疗 DSS 诱导的小鼠结肠炎时,可通过促进黏膜上皮细胞再生和肠道结构快速恢复,介导肠道组织重塑。

Zhang 等<sup>[19]</sup>报道了生姜外泌体在口服后可有效靶向结肠,减少促炎细胞因子如肿瘤坏死因子 $\alpha$ (tumor necrosis factor,TNF- $\alpha$ )、白细胞介素 6(interleukin-6,IL-6)、白细胞介素 1 $\beta$ (interleukin-6,IL-1 $\beta$ )的表达,增加抗炎细胞因子如白细胞介素 10(interleukin-10,IL-10)和白细胞介素 22(interleukin-22,IL-22)的表达,修复肠道屏障,预防慢性结肠炎和结肠炎相关的癌症。结肠是 IBD 的炎症部位,小鼠口服生姜外泌体后,外泌体可以有效保留在结肠中,避免全身给药带来的毒性。此外,生姜根茎还被报道也可以抑制核苷酸结合寡聚结构域样受体热蛋白结构域相关蛋白 3(the nucleotide-binding domain and leucine-rich repeat-containing family,pyrin domain-containing 3,NLRP 3)炎症小体的激活。炎症小体 NLRP 3 是免疫反应的关键调节因子,与自身炎症性疾病<sup>[39]</sup>、神经退行性疾病<sup>[40]</sup>等多种疾病的发生密切相关,目前专门抑制炎症小体的疗法尚未开发。Chen 等<sup>[41]</sup>从 9 种蔬菜和水果中提取出外泌体,发现生姜外泌体对炎症小体的抑制作用最强。因此可利用生姜外泌体靶向炎症小体 NLRP 3 以延缓或预防这些疾病的进展。

除自身的治疗作用,生姜外泌体还可用作口服药物载体。IBD 可采用抗 TNF- $\alpha$  抗体治疗,拮抗促炎因子 TNF- $\alpha$  的活性,但是抗 TNF- $\alpha$  抗体会引起严重的不良反应,疗效不理想<sup>[42-43]</sup>。Mao 等<sup>[44]</sup>利用生姜外泌体作为载体,通过口服特异性地将抗 TNF- $\alpha$  抗体递送至炎症部位,减轻了非肠道给药后因全身性免疫抑制而产生的不良反应。他们将抗 TNF- $\alpha$  抗体英夫利昔(infliximab,INF)嵌合在介孔硅纳米粒中,然后将生姜外泌体涂抹在介孔硅表面。该纳米制剂可稳定通过胃肠道,保护抗体不被降解,且可靶向结肠,到达结肠后释放 INF,发挥治疗作用。

Deng 等<sup>[15]</sup>证实西蓝花外泌体通过靶向 DCs 维持肠道免疫稳态,他们构建了 3 种小鼠结肠炎模型,

用西蓝花外泌体预处理结肠炎小鼠后,可明显减轻结肠炎引起的体重减轻、结肠缩短以及炎症细胞浸润,同时还降低了干扰素  $\gamma$  (interferon- $\gamma$ , IFN- $\gamma$ )、TNF- $\alpha$  等炎症性细胞因子的分泌,说明西蓝花外泌体可以预防小鼠结肠炎。磷酸腺苷活化蛋白激酶 (adenosine monophosphate-activated protein kinase, AMPK) 作为调节能量稳态的关键激酶,在调节免疫稳态中发挥重要作用<sup>[45]</sup>,可在巨噬细胞、树突状细胞等多种免疫细胞中表达,控制免疫细胞的功能。在研究西蓝花外泌体抑制结肠炎发展的机制时发现,与 PBS 组相比,西蓝花外泌体处理后小鼠结肠组织中活化的 AMPK 蛋白水平更高,说明西蓝花外泌体通过增强 AMPK 的信号传导预防小鼠结肠炎,西蓝花外泌体中含有的萝卜硫素,在治疗小鼠结肠炎方面发挥主要作用。因此,来自可食用植物来源的外泌体可调节微生物群与宿主免疫系统的相互交流,触发细胞内级联反应,恢复免疫稳态,这有助于人们制定更合理的饮食计划,预防慢性炎症性疾病。

**1.2.2 治疗脑部炎症** 研究报道燕麦提取物具有抗炎作用,可维持大脑正常功能,预防脑部神经炎症<sup>[46]</sup>。小胶质细胞是中枢神经系统中的巨噬细胞,在维持大脑正常活动和中枢神经系统健康方面发挥重要作用,酒精可激活小胶质细胞诱导脑部炎症反应。Xu 等<sup>[20]</sup>的研究表明燕麦外泌体可抑制大脑炎症,改善酒精诱导的小鼠脑记忆损伤。他们构建了酒精诱导的小鼠脑部炎症模型,小鼠口服燕麦外泌体后转运至大脑,被小胶质细胞摄取,显著抑制酒精诱导的小胶质细胞激活,降低炎症性细胞因子 IL-6, IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  的分泌。体外细胞实验显示,燕麦外泌体可抑制乙醇引起的小胶质细胞活化。以上结果说明燕麦外泌体可抑制大脑炎症。同时他们发现,dectin-1 信号传导参与多种神经免疫过程,致病条件下会上调 IL-1 $\beta$  和 TNF- $\alpha$  等促炎因子的表达,引发炎症反应。饮酒后小鼠脑中的乙醇会激活 dectin-1 介导的炎症途径,燕麦外泌体中含有的  $\beta$ -葡聚糖可与小胶质细胞的海马钙蛋白 (hippocalcin, HPCA) 相互作用而被小胶质细胞摄取,随后  $\beta$ -葡聚糖/HP-CA 将 Rab11a 招募到 HPCA 复合物中,Rab11a 在细胞膜蛋白的再循环过程中发挥重要作用,促进 dectin-1 从高尔基体易位到早期内体和溶酶体,导致 dectin-1 运输途径的改变,阻止酒精诱导的脑部炎症通路的激活,改善饮酒小鼠的脑记忆功能,发挥抗炎作用。

**1.2.3 治疗关节炎** 类风湿关节炎是一种炎症性疾病,会破坏软骨和骨组织,可能由肥胖、吸烟等因素引起,也可能是自身免疫性疾病<sup>[47]</sup>,而增加乳制品摄入可以降低炎症风险<sup>[48]</sup>。Arntz 等<sup>[21]</sup>首次报道了口服牛奶外泌体可明显改善关节炎。他们构造了白细胞介素-1 受体拮抗剂 (interleukin-1 receptor antagonists, IL-1Ra) 基因缺失的自发性小鼠关节炎和胶原蛋白诱导的关节炎 (collagen-induced arthritis, CIA) 2 种模型。在 IL-1Ra 缺陷的小鼠关节炎模型中,给小鼠口服约 170 和 1 200  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  2 种浓度的牛奶外泌体,与对照组相比,口服低剂量的牛奶外泌体在疾病发作和宏观评分方面均无显著差异,而口服高剂量的牛奶外泌体可以明显减缓小鼠关节炎的发展,表现为软骨耗竭程度减弱、骨髓细胞数量显著减少。在 CIA 模型中,给小鼠口服约 38 和 115  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  2 种浓度的牛奶外泌体,高剂量治疗组的关节炎发展延迟。踝关节组织学分析结果显示关节炎减轻、软骨耗竭减弱、骨髓细胞数量减少,说明口服牛奶外泌体对这 2 种关节炎模型具有治疗作用。以上结果表明类风湿关节炎患者可通过喝牛奶增加骨密度,减轻骨质疏松的程度。

### 1.3 对肠道细菌的调节作用

肠道菌群与人体健康有着密切的联系,从 20 世纪开始人们就试图通过调节肠道微生物群来提高健康水平。肠道菌群在维持宿主生理方面发挥重要作用,不健康饮食导致的肠道菌群改变可能会带来一系列代谢紊乱。Teng 等<sup>[22]</sup>的研究表明植物来源的外泌体被肠道微生物群吸收后,可改变肠道微生物群的组成。给小鼠口服生姜外泌体 1 周后,收集粪便样本进行 16S rRNA 基因测序分析,结果显示与 PBS 组相比,口服生姜外泌体的小鼠体内乳酸杆菌科和拟杆菌科的相对丰度增加,而梭状芽孢杆菌科的相对丰度减少;对小鼠口服 PKH26 标记的生姜外泌体后进行共聚焦成像分析,结果显示生姜外泌体可被肠道细菌吸收;经生姜外泌体处理的肠道细菌鼠李糖乳杆菌 (lactobacillus rhamnosus GG, LGG) 的 mRNA 和蛋白质表达均发生变化;以上研究结果说明生姜外泌体可以重塑肠道微生物群。

梭状芽孢杆菌是抗生素有关结肠炎的主要致病因素,目前对艰难梭状芽孢杆菌感染 (clostridioides difficile infection, CDI) 的主要治疗方法是服用万古霉素和甲硝唑<sup>[49]</sup>,复发率较高,因此,需要开发一种高效替代抗生素的方法治疗 CDI。柠檬在重塑肠道

微生物群方面发挥重要作用,柠檬外泌体可通过增加益生菌在肠道中的存活率抑制 CDI。Lei 等<sup>[23]</sup>报道了柠檬外泌体和益生菌协同保护小鼠免受 CDI 的作用。与仅使用 LGG 和嗜热链球菌 (*Streptococcus thermophilus* ST-21, STH) 治疗相比,柠檬外泌体与 LGG 和 STH 共同治疗 CDI 小鼠时,可以显著提高小鼠生存率,减轻结肠缩短,保护肠道屏障完整性。使用柠檬外泌体预处理后,STH 的胆汁抗性增加了 10 倍,通过胃肠道时的存活率显著提高。以上结果表明柠檬外泌体与 LGG 和 STH 联用可用于治疗 CDI,且柠檬外泌体没有免疫毒性,口服后未发现任何不良反应,在临床应用方面优势显著。

除了植物外泌体,牛奶外泌体中含有的蛋白质和 miRNA 也可以通过调节肠道微生物群重塑肠道屏障。肠道菌群失衡被认为是导致结肠炎的原因之一,Tong 等<sup>[24]</sup>使用 DSS 诱导的结肠炎小鼠模型研究牛奶外泌体对肠道菌群的作用。评估肠道微生物菌群多样性的 Chao 1 指数在 DSS 诱导的小鼠中降低,表明结肠炎小鼠肠道菌群多样性降低。经牛奶外泌体治疗后,小鼠肠道菌群的多样性提高。此外,与正常小鼠相比,DSS 诱导的结肠炎小鼠肠道细菌的相对丰度发生了改变,而牛奶外泌体使细菌的相对丰度几乎恢复到正常水平。因此牛奶外泌体可以改善 DSS 诱导的结肠炎小鼠的肠道菌群。同时牛奶外泌体可以通过重塑肠道屏障恢复 DSS 诱导的结肠炎小鼠的肠道免疫力,利用 Spearman 等级对肠道微生物群和细胞因子进行相关性分析,发现有害细菌的数量与促炎细胞因子的分泌呈正相关,有益细菌的数量与促炎细胞因子的分泌呈负相关,说明牛奶外泌体可以通过恢复肠道菌群的多样性调节肠道免疫稳态。

#### 1.4 肝保护作用

植物来源的外泌体会对肠道产生多种作用,关于它们是否会通过肠道对肝脏产生作用,Zhuang 等<sup>[25]</sup>研究了口服生姜外泌体对乙醇诱导的小鼠肝损伤的影响,发现小鼠口服生姜外泌体后,主要通过血管从肠道迁移到肝脏,生姜外泌体携带其活性成分姜烯酚靶向递送至肝细胞。核因子 NF-E2 相关因子 2 (nuclear factor erythroid 2-related factor 2, Nrf2) 是细胞氧化应激反应中的关键因子,可通过调节细胞保护性基因的表达,对细胞的毒性损伤起保护作用。生姜外泌体中含有的姜烯酚和其他活性成分,可显著增加 Nrf2 核转位,与抗氧化反应元件 (an-

tioxidant response element, ARE) 结合,启动下游抗氧化酶基因的转录,诱导肝脏中解毒/抗氧化基因的表达,同时抑制活性氧的产生,发挥肝保护的作用。谷丙转氨酶 (alanine aminotransferase, ALT) 和谷草转氨酶 (aspartate aminotransferase, AST) 是检测肝功能的 2 种常用血液生化标志物。正常情况下,血清中 2 种生化标志物的含量很低。当肝细胞受损时,细胞膜通透性增加,AST 和 ALT 的含量增加。与 PBS 组相比,生姜外泌体处理的酒精诱导肝损伤小鼠血清中 ALT 和 AST 水平显著降低。三酰甘油 (triglyceride, TG) 是血脂的一种成分,升高后导致血管内脂肪颗粒增多,容易沉积到血管,影响肝脏正常功能,生姜外泌体灌胃的小鼠肝脏 TG 水平降低;同时,经生姜外泌体处理后,脂滴减少,说明生姜外泌体可以防止酒精诱导的肝损伤发展。以上结果说明生姜外泌体可以跨越种间屏障,对机体产生保护作用,修复酒精诱导的肝损伤,介导物种间通讯。

#### 2 展望

静脉注射由于起效迅速、生物利用度高、可避免首过效应等优势而被广泛应用<sup>[50]</sup>,但是许多药物在注射时具有刺激性,可能引起感染和不良反应。在使用任何药物时,都应该确保其在体内安全性高、不良反应小,因此在考虑药物吸收的同时,选择侵入性较小的给药方式,可避免引起患者的并发症和不良反应,疗效更好<sup>[51-53]</sup>。口服给药方式简单、患者依从性好、医疗成本低,所以开发口服制剂逐渐成为科学家追求的目标。

哺乳动物细胞分泌的外泌体已经在疾病诊断和治疗中显示出重要作用<sup>[54-55]</sup>,但是安全性低、产量少、提取成本高、存在免疫排斥反应、缺乏靶向性等一系列问题限制了其大规模的开发应用。相比之下,从食物中提取的外泌体具有很多优势,例如:免疫原性低、价廉易得、具有组织特异靶向性,同时还可以与哺乳动物细胞发生信息交换,实现跨物种交流。此外,与传统的药物载体如合成纳米粒和脂质体相比,FDEs 具有更低的体内毒性、更高的组织靶向性和更长的体内循环时间,被认为是良好的药物递送载体。因此 FDEs 在疾病的诊疗和用作药物递送载体方面具有很大的临床应用潜力<sup>[56-57]</sup>。

本研究系统总结了目前 FDEs 作为口服制剂在疾病治疗中的应用,主要包括 FDEs 的抗肿瘤作用、炎症治疗作用、肠道细菌调节作用和肝保护作用,以及 FDEs 的作用机制,这对于人们开发基于 FDEs 的

口服制剂具有重要的理论意义和参考价值。目前,一些 FDEs 的作用机制尚不明确,如:牛奶外泌体对关节炎的保护作用机制、是否对类风湿关节炎有治疗作用、牛奶外泌体中的哪些特定分子可发挥抗肿瘤作用、口服柠檬外泌体与肠道细菌的相互作用机制。在临床应用之前,这些机制需要进一步深入探索和明确。此外 FDEs 用于实际生产还存在一些问题:① 缺乏统一的技术、专业人员和监督管理制度支持实施批量大规模生产 FDEs。② 缺乏统一的分离技术和设备从食物中分离出纯度较高的外泌体。③ FDEs 作为药物载体时,如何实现有效的药物装载也急需解决。随着医学技术的发展,FDEs 的作用效果和作用机制将会进一步明确,其在口服药物制剂的应用方面具有广阔的前景。

### [ 参 考 文 献 ]

- [1] CHIVERE VT, KONDIAH PPD, CHOONARA YE, *et al.* Nanotechnology-based biopolymeric oral delivery platforms for advanced cancer treatment[J]. *Cancers (Basel)*, 2020, 12(2): 522.
- [2] ZHANG MZ, MERLIN D. Nanoparticle-based oral drug delivery systems targeting the colon for treatment of ulcerative colitis[J]. *Inflamm Bowel Dis*, 2018, 24(7): 1401 - 1415.
- [3] MATHUR P, RAWAL S, PATEL B, *et al.* Oral delivery of anti-cancer agents using nanoparticulate drug delivery system [J]. *Curr Drug Metab*, 2019, 20(14): 1132 - 1140.
- [4] LIU L, YAO WD, RAO YF, *et al.* pH-Responsive carriers for oral drug delivery: challenges and opportunities of current platforms[J]. *Drug Deliv*, 2017, 24(1): 569 - 581.
- [5] LINDENBERGH MFS, STOOORVOGEL W. Antigen presentation by extracellular vesicles from professional antigen-presenting cells [J]. *Annu Rev Immunol*, 2018, 36: 435 - 459.
- [6] 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.
- [7] KIM H, JANG H, CHO H, *et al.* Recent advances in exosome-based drug delivery for cancer therapy[J]. *Cancers (Basel)*, 2021, 13(17): 4435.
- [8] YANG CH, ZHANG MZ, MERLIN D. Advances in plant-derived edible nanoparticle-based lipid nano-drug delivery systems as therapeutic nanomedicines [J]. *J Mater Chem B*, 2018, 6(9): 1312 - 1321.
- [9] WANG QL, ZHUANG XY, MU JY, *et al.* Delivery of therapeutic agents by nanoparticles made of grapefruit-derived lipids[J]. *Nat Commun*, 2013, 4: 1867.
- [10] SEDYKH S, KULESHOVA A, NEVINSKY G. Milk exosomes: perspective agents for anticancer drug delivery[J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(18): 6646.
- [11] ZHANG MZ, 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]. *Mol Ther*, 2016, 24(10): 1783 - 1796.
- [12] IRAVANI S, VARMA RS. Plant-derived edible nanoparticles and miRNAs; emerging frontier for therapeutics and targeted drug-delivery[J]. *ACS Sustainable Chem Eng*, 2019, 7(9): 8055 - 8069.
- [13] WANG BM, ZHUANG XY, DENG ZB, *et al.* Targeted drug delivery to intestinal macrophages by bioactive nanovesicles released from grapefruit[J]. *Mol Ther*, 2014, 22(3): 522 - 534.
- [14] JU SW, MU JY, DOKLAND T, *et al.* Grape exosome-like nanoparticles induce intestinal stem cells and protect mice from DSS-induced colitis[J]. *Mol Ther*, 2013, 21(7): 1345 - 1357.
- [15] DENG ZB, 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(7): 1641 - 1654.
- [16] 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): 19514 - 19527.
- [17] RAIMONDO S, SAEIEVA L, CRISTALDI M, *et al.* Label-free quantitative proteomic profiling of colon cancer cells identifies acetyl-CoA carboxylase alpha as antitumor target of Citrus Limon-derived nanovesicles[J]. *J Proteom*, 2018, 173: 1 - 11.
- [18] SAMUEL M, FONSEKA P, SANWLANI R, *et al.* Oral administration of bovine milk-derived extracellular vesicles induces senescence in the primary tumor but accelerates cancer metastasis[J]. *Nat Commun*, 2021, 12(1): 3950.
- [19] ZHANG MZ, 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.
- [20] XU FY, MU JY, TENG Y, *et al.* Restoring oat nanoparticles mediated brain memory function of mice fed alcohol by sorting inflammatory lectin-1 complex into microglial exosomes [J]. *Small*, 2022, 18(6): e2105385.
- [21] ARNTZ OJ, PIETERS BC, OLIVEIRA MC, *et al.* Oral administration of bovine milk derived extracellular vesicles attenuates arthritis in two mouse models [J]. *Mol Nutr Food Res*, 2015, 59(9): 1701 - 1712.
- [22] TENG Y, REN Y, SAYED M, *et al.* Plant-derived exosomal microRNAs shape the gut microbiota[J]. *Cell Host Microbe*, 2018, 24(5): 637 - 652. e8.
- [23] LEI C, MU JY, TENG Y, *et al.* Lemon exosome-like nanoparticles-manipulated probiotics protect mice from *C. diff* infection [J]. *iScience*, 2020, 23(10): 101571.
- [24] TONG LJ, HAO HN, ZHANG Z, *et al.* Milk-derived extracellular vesicles alleviate ulcerative colitis by regulating the gut immunity and reshaping the gut microbiota [J]. *Theranostics*, 2021, 11(17): 8570 - 8586.
- [25] ZHUANG XY, DENG ZB, MU JY, *et al.* Ginger-derived nanoparticles protect against alcohol-induced liver damage [J]. *J Extracell Vesicles*, 2015, 4: 28713.
- [26] QIU HB, CAO SM, XU RH. Cancer incidence, mortality, and burden in China: a time-trend analysis and comparison with the United States and United Kingdom based on the global epidemiological data released in 2020 [J]. *Cancer Commun (Lond)*, 2021, 41(10): 1037 - 1048.
- [27] BRAY F, FERLAY J, SOERJOMATARAM I, *et al.* Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries [J]. *CA Cancer J Clin*, 2018, 68(6): 394 - 424.
- [28] CIRMI S, MAUGERI A, FERLAZZO N, *et al.* Anticancer potential of Citrus juices and their extracts: a systematic review of both preclinical and clinical studies [J]. *Front Pharmacol*, 2017, 8: 420.
- [29] YANG M, LIU XY, LUO QQ, *et al.* An efficient method to isolate lemon derived extracellular vesicles for gastric cancer therapy [J]. *J Nanobiotechnology*, 2020, 18(1): 100.
- [30] HAUG A, HØSTMARK AT, HARSTAD OM. Bovine milk in human nutrition; a review [J]. *Lipids Health Dis*, 2007, 6: 25.
- [31] HANEY MJ, KLYACHKO NL, ZHAO YL, *et al.* Exosomes as drug delivery vehicles for Parkinson's disease therapy [J]. *J Control Release*, 2015, 207: 18 - 30.

- [32] BENMOUSSA A, LEE CH, LAFFONT B, *et al.* Commercial dairy cow milk microRNAs resist digestion under simulated gastrointestinal tract conditions[J]. *J Nutr*, 2016, 146(11): 2206 – 2215.
- [33] ZHONG J, XIA BZ, SHAN SB, *et al.* High-quality milk exosomes as oral drug delivery system [J]. *Biomaterials*, 2021, 277: 121126.
- [34] YAO Q, GUTIERREZ DC, HOANG NH, *et al.* Efficient code-livery of paclitaxel and curcumin by novel bottlebrush copolymer-based micelles[J]. *Mol Pharm*, 2017, 14(7): 2378 – 2389.
- [35] AGRAWAL AK, AQIL F, JEYABALAN J, *et al.* Milk-derived exosomes for oral delivery of paclitaxel[J]. *Nanomed-Nanotechnol Biol Med*, 2017, 13(5): 1627 – 1636.
- [36] MUNAGALA R, AQIL F, JEYABALAN J, *et al.* Exosomal formulation of anthocyanidins against multiple cancer types [J]. *Cancer Lett*, 2017, 393: 94 – 102.
- [37] AQIL F, JEYABALAN J, AGRAWAL AK, *et al.* Exosomal delivery of berry anthocyanidins for the management of ovarian cancer[J]. *Food Funct*, 2017, 8(11): 4100 – 4107.
- [38] RIVERA AP, FLORES MONAR GV, ISLAM H, *et al.* Ulcerative colitis-induced colorectal carcinoma; a deleterious concatenation[J]. *Cureus*, 2022, 14(2): e22636.
- [39] MASTERS SL, SIMON A, AKSENTIJEVICH I, *et al.* Horror autoinflammatory: the molecular pathophysiology of autoinflammatory disease ( \* ) [J]. *Annu Rev Immunol*, 2009, 27: 621 – 668.
- [40] HENEKA MT, KUMMER MP, STUTZ A, *et al.* NLRP3 is activated in Alzheimer's disease and contributes to pathology in APP/PS1 mice[J]. *Nature*, 2013, 493(7434): 674 – 678.
- [41] CHEN XY, ZHOU Y, YU JJ. Exosome-like nanoparticles from ginger rhizomes inhibited NLRP3 inflammasome activation [J]. *Mol Pharm*, 2019, 16(6): 2690 – 2699.
- [42] PUGLIESE D, FELICE C, PAPA A, *et al.* Anti TNF- $\alpha$  therapy for ulcerative colitis: current status and prospects for the future [J]. *Expert Rev Clin Immunol*, 2017, 13(3): 223 – 233.
- [43] CHUDY-ONWUGAJE KO, CHRISTIAN KE, FARRAYE FA, *et al.* A state-of-the-art review of new and emerging therapies for the treatment of IBD[J]. *Inflamm Bowel Dis*, 2019, 25(5): 820 – 830.
- [44] MAO YL, HAN MQ, CHEN CS, *et al.* A biomimetic nanocomposite made of a ginger-derived exosome and an inorganic framework for high-performance delivery of oral antibodies [J]. *Nanoscale*, 2021, 13(47): 20157 – 20169.
- [45] ANTONIOLI L, COLUCCI R, PELLEGRINI C, *et al.* The AMPK enzyme-complex; from the regulation of cellular energy homeostasis to a possible new molecular target in the management of chronic inflammatory disorders[J]. *Expert Opin Ther Targets*, 2016, 20(2): 179 – 191.
- [46] YAU YF, EL-NEZAMI H, GALANO JM, *et al.* Lactobacillus rhamnosus GG and oat beta-glucan regulated fatty acid profiles along the gut-liver-brain axis of mice fed with high fat diet and demonstrated antioxidant and anti-inflammatory potentials [J]. *Mol Nutr Food Res*, 2020, 64(18): e2000566.
- [47] MADAV Y, BARVE K, PRABHAKAR B. Current trends in theranostics for rheumatoid arthritis[J]. *Eur J Pharm Sci*, 2020, 145: 105240.
- [48] DA SILVA MS, RUDKOWSKA I. Dairy nutrients and their effect on inflammatory profile in molecular studies[J]. *Mol Nutr Food Res*, 2015, 59(7): 1249 – 1263.
- [49] STEVENS VW, NELSON RE, SCHWAB-DAUGHERTY EM, *et al.* Comparative effectiveness of vancomycin and metronidazole for the prevention of recurrence and death in patients with Clostridium difficile infection[J]. *JAMA Intern Med*, 2017, 177(4): 546 – 553.
- [50] WANG L, RAO YF, LIU XL, *et al.* Administration route governs the therapeutic efficacy, biodistribution and macrophage targeting of anti-inflammatory nanoparticles in the lung[J]. *J Nanobiotechnology*, 2021, 19(1): 56.
- [51] 万妮,陈斌,李合,等.肺部吸入给药系统的研究进展[J].中国新药杂志,2021,30(15):1386 – 1395.
- [52] 郑凡,夏如冰,饶晓静.抗菌药物不同给药方式对妇科经阴道手术术后切口感染的预防效果及药物经济学分析[J].今日药学,2022,32(4):306 – 309.
- [53] 黄炜忠,毛鑫,黄木兰,等.罗浮山百草油大鼠雾化吸入毒性研究[J].今日药学,2022,32(4):264 – 267.
- [54] 边阳萍,刘建辉.脂源性外泌体与肥胖诱导的代谢性炎症研究进展[J].中国现代应用药学,2021,38(8):1008 – 1011.
- [55] 刘森,葛金芳.外泌体在2型糖尿病发病机制及诊疗标志物开发中的研究进展[J].中国新药杂志,2022,31(3):237 – 244.
- [56] KIM J, LI SY, ZHANG SY, *et al.* Plant-derived exosome-like nanoparticles and their therapeutic activities[J]. *Asian J Pharm Sci*, 2022, 17(1): 53 – 69.
- [57] DAD HA, GU TW, ZHU AQ, *et al.* Plant exosome-like nanovesicles: emerging therapeutics and drug delivery nanoplatfoms[J]. *Mol Ther*, 2021, 29(1): 13 – 31.

编辑:蒋欣欣/接受日期:2022 – 10 – 06