

• 药剂与工艺 •

人参根外泌体的提取、表征及其对多柔比星诱导的心肌损伤保护作用机制

刘恬佳, 邱智东, 邱 野, 陈亚君, 胡 爽, 刘 达*

长春中医药大学药学院, 吉林 长春 130117

摘要: 目的 研究人参 *Panax ginseng* 根外泌体提取、表征及其体外心肌保护活性。方法 采用差速离心法与蔗糖梯度离心法提取人参根外泌体; 通过透射电子显微镜 (TEM) 和纳米颗粒跟踪分析 (nanoparticle tracking analysis, NTA) 技术对外泌体进行鉴定; 采用液相色谱-质谱联用 (LC-MS) 法对人参根外泌体进行蛋白质组学分析; 通过 Small RNA 测序分析人参根外泌体中 Small RNA 种类; 建立 H9C2 心肌细胞损伤模型, 利用 CCK-8 法检测细胞活力; 以最佳质量浓度的人参根外泌体处理 H9C2 细胞, 应用 Hoechst 染色和 JC-1 染色考察细胞凋亡率; 蛋白质免疫印迹法检测细胞凋亡相关蛋白。结果 TEM 图中清晰可见人参根外泌体呈茶托状的双层膜结构; NTA 粒径分析检测到 112.7 nm 的人参根外泌体占总人参根外泌体的 92.7%; 蛋白组学分析鉴定到 5585 个蛋白; Small RNA 测序鉴定到 miRNA、tRNA、snRNA、rRNA、snoRNA 5 种 Small RNA; 体外实验结果显示, 与对照组相比, 模型组细胞活力下降, 人参根外泌体给药组呈剂量依赖性地使细胞活力升高, 细胞凋亡率降低; Western blotting 结果显示凋亡相关蛋白 Bcl-2 蛋白水平下降; Bax、Cyt C 的蛋白水平升高。结论 首次报道了人参根外泌体的提取工艺及表征, 并发现人参根外泌体对多柔比星诱导的心肌损伤具有一定的保护作用。

关键词: 人参; 外泌体; 多柔比星; H9C2 细胞; 心肌损伤; 细胞凋亡; 差速离心法; 梯度离心法; Small RNA

中图分类号: R283.6 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2021)12-3514-08

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2021.12.006

A preliminary study on protective mechanism of ginseng root exosomes against doxorubicin induced myocardial injury

LIU Tian-jia, QIU Zhi-dong, QIU Ye, CHEN Ya-jun, HU Shuang, LIU Da

School of Pharmacy, Changchun University of Chinese Medicine, Changchun 130117, China

Abstract: **Objective** To study the extraction process of ginseng root exosomes and its cardiac protective activity. **Methods** Extraction of ginseng root exosomes was carried out by differential centrifugation and sucrose gradient centrifugation; The exosomes were identified by transmission electron microscope and NTA granulometric analysis; Proteomic analysis of ginseng root exosomes was performed by liquid chromatography-mass spectrometry; Small RNA species in ginseng root exosomes were analyzed by Small RNA sequencing; H9C2 cardiomyocytes injury model was established and the cell viability was detected by CCK-8 assay; H9C2 cells were treated with the best concentration of ginseng root exosomes, and the apoptosis rate was determined by Hoechst and JC-1 staining; The apoptosis of related proteins was detected by Western blot. **Results** Double-layer membrane structure of ginseng root exosomes was clearly visible under transmission electron microscope; NTA particle size analysis showed that ginseng root exosomes with 112.7 nm particle size length was accounting for 92.7% of the total ginseng root exosomes. A total of 5585 proteins were identified by proteomic analysis; Small RNA sequencing identified five Small RNAs: miRNA, tRNA, snRNA, rRNA and snoRNA. The results of *in vitro* experiments showed that the cell viability of the model group was lower than that of the control group. Ginseng root exosomes increased cell viability and decreased apoptosis rate in a dose-dependent manner; The results of Western Blot showed that Bcl-2 protein level was decreased. Bax, Cyt C protein levels were increased. **Conclusion** In this study, the extraction

收稿日期: 2021-02-18

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81973712); 国家自然科学基金资助项目 (81803680); 国家自然科学基金资助项目 (82003985); 中国博士后科学基金资助项目 (2020M670825); 中国博士后科学基金资助项目 (2020T130568)

作者简介: 刘恬佳 (1991—), 女, 博士研究生, 研究方向为中药药剂学。E-mail: 267089397@qq.com

*通信作者: 刘 达, 男, 副教授, 研究方向为分子生物学。Tel: 18743010987 E-mail: liuda_1986@163.com

process and identification of ginseng root exosomes were reported for the first time, and the protective effect of ginseng root exosomes on doxorubicin-induced myocardial injury was found.

Key words: ginseng; exosomes; doxorubicin; H9C2 cells; myocardial injury; cell apoptosis; differential centrifugation; gradient centrifugation technique; Small RNA

外泌体具有独特的形态和成分特征,它包含在由多个核内体与质膜融合形成的多泡小体中,直径为 30~150 nm,是一种具有脂质双层膜结构的囊泡。外泌体中携带母体细胞特征性生物信息分子如蛋白质、脂质、DNA 和非编码 RNA 等,具有天然的分子转运特性和良好的生物相容性^[1]。近年来对于外泌体领域的研究飞速发展,主要集中在心血管^[2]、肿瘤^[3]、神经系统^[4]、干细胞^[5]等方面。但是国内外对于外泌体的研究主要集中在动物外泌体上,而植物外泌体的研究还处在初步阶段。尽管对其起源、组成及其功能的研究甚少,但是一些研究已经表明植物来源的外泌体可能参与植物细胞间的细胞通讯,是能够作为调节植物先天免疫的手段。目前已经成功从葡萄^[6]、生姜^[7]、小麦^[8]、柠檬^[9]等植物中成功提取出外泌体并证实其生物活性。

人参因具有抗癌、抗炎、抗氧化等多种药理作用^[10-11]而深受众人喜爱。近年来人参被关注到具有心脏保护的作用,如人参皂苷 Re 可减轻过氧化氢对心肌细胞的毒性并增加一氧化氮(NO)生成发挥多种有利于心脏保护的作用^[12-13]。Zhu 等^[14]发现人参皂苷 Rg₁通过抗氧化作用和降低细胞内钙水平提高缺氧心肌细胞的细胞活力。人参皂苷 Rb₁也可通过多种机制发挥心脏保护作用^[15]。Cui 等^[16]从实验和临床研究中总结了人参、人参皂苷和人参制品对缺血和再灌注心肌损伤的直接保护作用的证据。现有报道对人参根中皂苷、多糖等成分研究较多,但这些成分生物利用度较低。为了解决这一问题,在植物制剂的研究中科学研究逐渐侧重于开发新的药物递送系统,如脂质体、外泌体、纳米颗粒等。外泌体本身可携带原始细胞的表面受体和配体发挥作用并且可以潜在地提高生物利用度,提高药物的有效性和安全性^[8-9,17]。

多柔比星(doxorubicin)是一种高效广谱的抗肿瘤药,在癌症治疗中得到广泛应用^[18-20]。然而,长期使用多柔比星可对机体产生一些严重的不良反应,特别是心脏毒性^[21-23]。随着多柔比星累积剂量的增加,患者发生多柔比星诱导的心脏毒性风险将会加重^[24]。一旦发生心力衰竭,患者的死亡率将显著增加。因此,多柔比星引起的心脏毒性限制了其

临床应用^[25]。本课题成功地通过差速离心、密度梯度离心等方法从人参根中分离纯化了外泌体,并考察其对多柔比星诱导的心脏毒性的保护作用,为治疗多柔比星诱导心脏毒性提供潜在的药物靶点。

1 仪器与材料

1.1 仪器

Smart R17 Plus 型高速冷冻离心机,韩国 Hanil Science Industrial 公司; wX+Ultra Series 型超速离心机、Countess II FL 型自动细胞计数仪、371 型 CO₂ 恒温培养箱、1384 型生物安全柜、iBright FL1000 型多功能凝胶成像系统、AMAFD 1000 型荧光显微镜, Thermo Fisher Scientific 公司; Spectra Max Paradigm 型酶标仪,美谷分子仪器有限公司; Power Pac™ Basic 型蛋白质电泳仪, Bio-Rad 公司; A00-1-1102 型流式细胞仪, Beckman Cytoflex 公司; Jeol1230 型透射电子显微镜(TEM),日本电子株式会社; ZetaView 型纳米颗粒跟踪分析仪,德国 Particle Metrix 公司。

1.2 药材与试剂

人参供试样品均采自吉林省东南部长白山西麓抚松县北岗镇农田人参栽培基地(42°24'48"N, 127°31'55"E,海拔 760 m)。经长春中医药大学中药鉴定教研室翁丽丽教授鉴定为五加科人参属植物人参 *Panax ginseng* C. A. Mey. 的新鲜根和根茎。盐酸多柔比星,北京索莱宝科技有限公司,质量分数≥99%,批号 D8740,规格 25 mg/瓶; DMEM 高糖培养基、胎牛血清,美国 Gibco 公司; BCA 蛋白定量试剂盒、极超敏 ECL 化学发光试剂盒,上海碧云天生物科技有限公司; 蛋白定量试剂盒,南京建成生物工程研究所; PBS、胰蛋白酶、青霉素链霉素双抗, Hyclone 公司; Cell Counting Kit-8 (CCK-8) 试剂盒,博士德生物工程有限公司; 碘代乙酰胺、二硫苏糖醇、尿素, Sigma 公司; 台盼兰、线粒体膜电位检测试剂盒(JC-1)、Hoechst33342 染色液,北京索莱宝科技有限公司; 抗体 β 肌动蛋白(β-actin)、凋亡相关蛋白 B 淋巴细胞瘤-2 基因(B-cell lymphoma-2, Bcl-2)、Bcl-2 相关 X 蛋白(Bcl-2 associated X protein, Bax)、细胞色素 C(cytochrome C, Cyt C), Cell Signaling Technology

公司；超纯水，Fisher Chemical 公司；磷钨酸溶液，北京中镜科技技术有限公司。

1.3 细胞株

大鼠心肌 H9C2 细胞来源于广州赛库生物技术有限公司。

2 方法与结果

2.1 人参根外泌体的提取

选取 1 kg 新鲜人参根清洗后进行破碎。采用差速离心法依次以 $1000\times g$ 离心 10 min, $3000\times g$ 离心 20 min, $10\,000\times g$ 离心 30 min, 取上清。将上清液置于固定角转子中, 以 $100\,000\times g$ 离心 1 h, 沉淀悬浮于 1 mL PBS 中。采用密度梯度离心法将样品转至 30%、45%、60% 蔗糖溶液 $150\,000\times g$ 离心 2 h, 收集 30%~45% 蔗糖溶液中间层, 加等量 PBS 洗去蔗糖 $150\,000\times g$ 离心 1 h, 收集沉淀, 1 mL PBS 吹悬沉淀, 得到外泌体溶液。

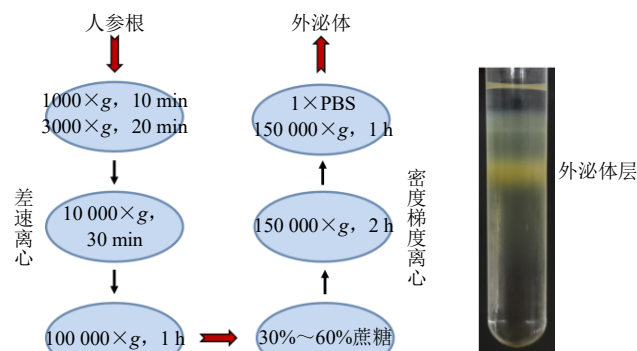


图 1 人参根外泌体分离主要步骤及结果示意图

Fig. 1 Schematic representation of major steps and results of ginseng root exosome separation

2.2 人参根外泌体的表征

2.2.1 TEM 检测 用吸管取 1 小滴样品于蜡盘上, 取铜网使有支持膜的表面与样品液表面接触, 静置 3~5 min 取出, 取出铜网, 用滤纸条吸除多余的液滴, 稍晾干。取 3% 磷钨酸溶液, 滴 1 小滴于蜡盘上。吸附有样品的铜网放置于染液表面 (样品与染液接触), 静置 3~5 min。取出铜网, 用滤纸条吸除多余的液滴, 白炽灯下晾干。TEM 拍照 (标尺分别为 100、200 nm), 观察人参根外泌体的形态, 结果清晰可见提取出的人参根外泌体形态呈茶托状, 具有双层膜结构且膜结构完整, 结果见图 2。

2.2.2 纳米颗粒跟踪分析 (nanoparticle tracking analysis, NTA) 技术分析人参根外泌体粒径 分离的外泌体样品用 1×PBS 缓冲液适当稀释, 应用 ZetaView PMX 110 仪器和相应软件 Zeta View

8.04.02, 使用纳米粒子跟踪分析 (NTA) 测量外泌体的粒径和浓度 (ZetaView 系统用 110 nm 的聚苯乙烯颗粒进行校准, 温度维持在 23、37 ℃)。通过 NTA 粒径分析检测到 112.7 nm 粒径长度的人参根外泌体占总人参根外泌体的 92.7%, 结果见图 3 和表 1。综上所述, 根据其形态和大小分析可以确定人参根中提取出的天然纳米囊泡为外泌体。

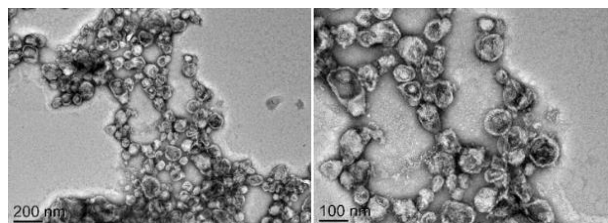


图 2 人参根外泌体 TEM 下形态观察

Fig. 2 Morphology of ginseng root exosomes under TEM

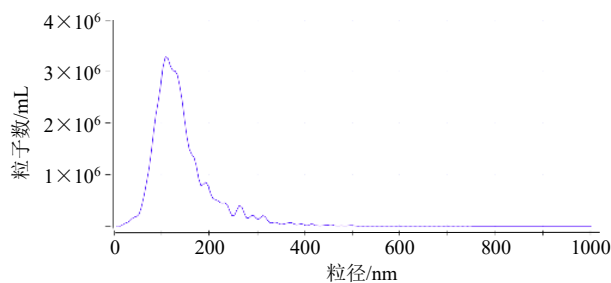


图 3 人参根外泌体 NTA 粒径分析

Fig. 3 NTA particle size analysis of ginseng root exosomes

表 1 人参根外泌体 NTA 粒径峰值分析结果

Table 1 Results of NTA particle size peak analysis of ginseng root exosomes

粒径/nm	粒子数/(个·mL ⁻¹)	半峰全宽/nm	占比/%
112.7	3.3×10^6	74.2	92.7
262.5	4.0×10^5	16.3	3.3
310.9	1.9×10^5	73.5	2.3
368.7	6.7×10^4	24.9	0.7
415.7	3.7×10^4	10.5	0.2

2.2.3 人参根外泌体中蛋白质含量测定 采用考马斯亮蓝蛋白法测定人参根外泌体中蛋白含量。按照考马斯亮蓝贮备液与双蒸水为 1:4 的比例进行配制, 备用。分别配制空白组、标准组、测定组样品, 空白组取 0.05 mL 双蒸水与 3 mL 考马斯亮蓝显色液混匀制得; 标准组取 0.05 mL 牛血清白蛋白 (BSA) 标准品 (质量浓度 0.524 g/L) 与 3 mL 考马斯亮蓝显色液混匀制得; 测定组取人参根外泌体样品 0.05 mL 与 3 mL 考马斯亮蓝显色液混匀制得。混匀后的空白组、标准组、测定组样品静置 10 min

后, 分别取 200 μL 于 595 nm 处测定吸光度 (A) 值, 每组重复 3 次。最终得到测定组 A 值为 0.229 1, 标准组 A 值为 0.203 9, 空白组 A 值为 0.144 8, 根据计算公式, 测得人参根外泌体中总蛋白的含量为 2.992 $\mu\text{g/g}$ 。

待测样本蛋白质质量浓度 = $(A_{\text{测定}} - A_{\text{空白}}) / (A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}) \times$ 标准品质量浓度 $\times$ 样品测试前稀释倍数

2.2.4 蛋白组学分析 取等量样品蛋白进行酶解, 用裂解液将体积调整至一致, 加入二硫苏糖醇 (DTT) 使其终浓度为 5 mmol/L, 56 $^{\circ}\text{C}$ 还原 30 min。加入碘乙酰胺 (IAA) 使其终浓度为 11 mmol/L, 室温避光孵育 15 min。将烷基化好的样本转移至超滤管, 室温 12 000 $\times g$ 离心 20 min, 用 8 mol/L 尿素置换 3 次, 再用置换 buffer 置换尿素 3 次, 以蛋白酶与蛋白质量比 1 : 50 的比例加入胰蛋白酶, 酶解过夜。室温 12 000 $\times g$ 离心 10 min 回收肽段, 再用超纯水回收肽段 1 次, 合并 2 次肽段溶液, 酸化后进行 Stage Tip 除盐。采用液相色谱-质谱联用法进行分析^[26-27], 得到总谱图数为 87 242, 匹配谱图数为 22 605。通过谱图解析共鉴定到 22 605 条肽段, 其中特异性肽段为 19 219, 鉴定到 5585 个蛋白。

2.2.5 Small RNA (sRNA) 测序分析 使用 AASRA 和 cmsearch 软件对人参根外泌体中所有 sRNA 与各类 RNA 进行比对。在比对过程中, 可能存在 1 个 sRNA 同时比对上 2 种不同的注释信息的情况。为了使每个 sRNA 有唯一的注释, 按照 MiRbase > pirnabank > snoRNA (human/plant) > Rfam > other sRNA 的优先级顺序将 sRNA 遍历注释。鉴定到人参根外泌体中各类 sRNA 所占比例如表 2 所示。

表 2 人参根外泌体中各类 sRNA 所占比例

Table 2 Proportion of sRNA in exosomes of ginseng roots exosomes

sRNA	占比/%	分类	各分项占比/%
genome	55.1	intergenic	82.6
		intron	12.1
		exon	5.3
sncRNA	22.3	snRNA	65.5
		rRNA	31.7
		tRNA	2.7
		snoRNA	0.1
unknown	22.3	unmap	99.1
		rfam gene	0.9
miRNA	0.3		

2.3 人参根外泌体对多柔比星诱导的心肌损伤保护作用机制

2.3.1 细胞培养及实验分组 大鼠心肌 H9C2 细胞培养于含 10% 胎牛血清、1% 青霉素和链霉素的 DMEM 培养基中, 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 饱和湿度培养箱培养。试验分为 3 组, 分别为对照组、模型组 (1 $\mu\text{mol/L}$ 多柔比星) 和药物干预组 (1 $\mu\text{mol/L}$ 多柔比星 + 不同质量浓度 20、40、80 $\mu\text{g/mL}$ 的人参根外泌体) 处理 24 h。

2.3.2 统计学分析 所有研究均进行至少 3 次的生物学重复实验, 数据以 $\bar{x} \pm s$ 形式表示, 多组间比较采用单因素方差分析, 组间两两比较采用 Tukey's 检验。统计学分析和作图应用 GraphPad Prism 8 和 ImageJ 软件。质谱数据分析应用 MaxQuant 软件。

2.3.3 人参根外泌体对 H9C2 细胞的细胞毒性测定 取对数生长期的 H9C2 细胞用胰蛋白酶消化, 离心, 重悬细胞, 台盼兰染色计数。将细胞悬液稀释成密度 5×10^3 个/mL, 接种于 96 孔板中, 每孔 200 μL , 置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 培养箱中培养。培养 24 h 细胞贴壁后, 开始加药处理。分别加入质量浓度为 0、5、10、20、40、60、80、100 $\mu\text{g/mL}$ 的人参根外泌体溶液每孔 200 μL , 每组设置 6 个复孔, 将 96 孔板重新放入培养箱中继续培养。24 h 后弃去培养液, 重新每孔加入新培养液 100 μL 、CCK-8 10 μL , 培养箱中孵育 2~4 h, 用酶标仪在 450 nm 波长处测定各孔的 A 值, 取平均值, 计算细胞存活率。

$$\text{细胞存活率} = (A_{\text{样品}} - A_{\text{空白}}) / (A_{\text{对照}} - A_{\text{空白}})$$

其中, 空白组只含有培养基, 仅用于计算细胞存活率, 对照组是细胞不加药, 样品组是细胞加药。结果见表 3, 人参根外泌体 5~100 $\mu\text{g/mL}$ 质量浓度作用于 H9C2 细胞时, 对 H9C2 细胞无毒性, 最终选择人参根外泌体 20、40、80 $\mu\text{g/mL}$ 进行以下实验。

2.3.4 多柔比星诱导 H9C2 细胞损伤浓度的筛选 为选择合适多柔比星造模的剂量, 按“2.3.3”项下方法处理, 每个孔分别加入浓度为 0、0.5、1、2、4、10 $\mu\text{mol/L}$ 的多柔比星溶液 200 μL , 每组设置 6 个复孔。测定细胞存活率, 取平均值作为实验结果。使用 GraphPad Prism 软件计算半抑制浓度 (half maximal inhibitory concentration, IC_{50}) 值, 结果见表 4。随着多柔比星处理浓度的不断增加, H9C2 细胞的存活率明显降低, 根据细胞的存活率计算 IC_{50} 值为 1.770 $\mu\text{mol/L}$ 。根据实际所需最终选择 H9C2 细胞的多柔比星诱导浓度为 1 $\mu\text{mol/L}$ 。

表 3 不同质量浓度人参根外泌体溶液对 H9C2 细胞存活率的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 3 Effects of different concentrations of ginseng root exosomes solution on survival rate of H9C2 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	质量浓度/($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	细胞存活率/%
对照	—	100.00 $\pm$ 0.03
给药	5	99.95 $\pm$ 0.07
	10	100.01 $\pm$ 0.02
	20	99.98 $\pm$ 0.03
	40	100.02 $\pm$ 0.02
	60	99.99 $\pm$ 0.01
	80	99.90 $\pm$ 0.05
	100	99.96 $\pm$ 0.06

表 4 不同浓度多柔比星对 H9C2 细胞存活率的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 4 Effect of different concentrations of doxorubicin on survival rate of H9C2 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	质量浓度/($\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)	细胞存活率/%
对照	—	100.00 $\pm$ 0.01
给药	0.5	76.83 $\pm$ 0.05
	1	62.84 $\pm$ 0.05
	2	46.33 $\pm$ 0.11
	4	29.33 $\pm$ 0.02
	10	15.16 $\pm$ 0.07

2.3.5 人参根外泌体对多柔比星损伤的 H9C2 细胞存活率的影响 按“2.3.3”项下方法处理, 每孔加入 1 $\mu\text{mol/L}$ 的多柔比星溶液 200 μL , 12 h 后弃去多柔比星溶液, 重新分别加入质量浓度分别为 20、40、80 $\mu\text{g/mL}$ 人参根外泌体溶液, 每孔 200 μL , 24 h 后弃去原有培养液, 重新每孔加入新培养液 100 μL , CCK-8 10 μL , 培养箱中孵育 2~4 h, 用酶标仪在 450 nm 波长处测定各孔的 A 值, 取平均值, 计算细胞存活率, 结果见表 5。与对照组相比, 模型组 H9C2 细胞经多柔比星处理后, 细胞活力显著减弱 ($P < 0.001$)。与模型组相比, 人参根外泌体 40、80 $\mu\text{g/mL}$ 给药组 H9C2 细胞存活率显著提高 ($P < 0.01$ 、 0.001), 提示, 人参根外泌体能剂量相关地改善多柔比星对 H9C2 细胞增殖的抑制。

2.3.6 人参根外泌体对多柔比星损伤的 H9C2 细胞凋亡的影响 (Hoechst 染色实验法) 取对数生长期的 H9C2 细胞, 胰蛋白酶消化并收集细胞, 按照 3×10^5 个/mL 密度接种于 6 孔板中, 继续培养 24 h

表 5 人参根外泌体对多柔比星损伤的 H9C2 细胞存活率的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 5 Effect of ginseng root exosomes on doxorubicin-damaged H9C2 cells viability ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	质量浓度/($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	细胞存活率/%
对照	—	100.00 $\pm$ 0.03
模型	1 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	66.53 $\pm$ 0.05 ^{###}
人参根外泌体	20	76.74 $\pm$ 0.08
	40	82.27 $\pm$ 0.11 ^{**}
	80	92.51 $\pm$ 0.06 ^{***}

与对照组比较: ^{###} $P < 0.001$; 与模型组比较: ^{**} $P < 0.01$ ^{***} $P < 0.001$

^{###} $P < 0.001$ vs control group; ^{**} $P < 0.01$ ^{***} $P < 0.001$ vs model group

细胞贴壁后弃上清液, 加入 1 $\mu\text{mol/L}$ 的多柔比星溶液, 12 h 后弃上清, 加入不同质量浓度的人参根外泌体 (0、20、40、80 $\mu\text{g/mL}$) 处理细胞, 培养 24 h 后弃去各孔中培养基, 加入少量 Hoechst 33342 工作液, 加入工作液的体积宜覆盖住 6 孔板中的细胞即可, 混匀。室温孵育 20 min。吸出 Hoechst 33342 染色液, 用 PBS 洗涤 3 次, 每次 5 min。直接在荧光显微镜下观察。Hoechst 荧光染料检测细胞凋亡结果见图 4, 多柔比星损伤后细胞形态发生染色质固缩, 细胞核呈致密浓染, 或呈碎块状致密浓染的比例显著增多, 即凋亡的细胞显著增加。随着给药组人参根外泌体溶液浓度增加, 上述现象逐渐减轻。

2.3.7 人参根外泌体对多柔比星损伤的 H9C2 细胞线粒体膜电位的影响 (JC-1 染色实验法) 细胞处理方法同“2.3.6”项, 弃去各孔中培养基, 加入少量 JC-1 工作液, 加入工作液的体积宜覆盖住 6 孔板中的细胞即可, 混匀。细胞培养箱中 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 20 min。孵育结束后吸除工作液, 用 JC-1 染色缓冲液 (1 $\times$) 洗涤 2 次, 加入 2 mL 细胞培养液。直接在荧光显微镜下观察。

线粒体通路是参与细胞凋亡发生最经典的通路之一, 在细胞凋亡的早期线粒体结构会发生一些显著变化^[28-29]。研究表明, 在不同因素诱导的细胞凋亡中, 在细胞形态学改变之前均出现线粒体膜电位的下降^[30]。JC-1 荧光染料检测细胞凋亡结果见图 5。对照组细胞呈红色聚集, 表现为正常的超极化膜电位。加入多柔比星后, 模型组细胞表现出明显的绿色 JC-1 单体, 线粒体膜电位降低。然而, 药物干预组线粒体膜电位逐渐升高, 表现淡红色和橙色荧光, 表明人参根外泌体对多柔比星诱导的线粒体膜电位降低具有明显的改善作用。

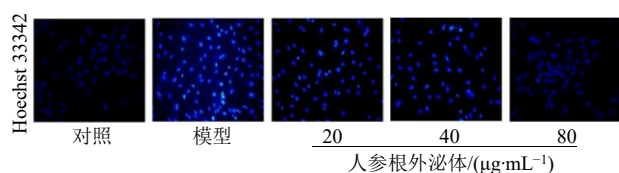


图 4 人参根外泌体对多柔比星损伤的 H9C2 细胞凋亡的影响

Fig. 4 Effect of ginseng root exosomes on doxorubicin-damaged H9C2 cells apoptosis

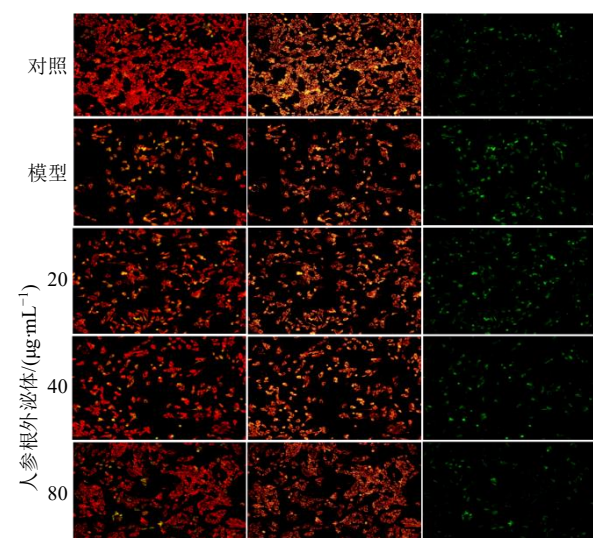


图 5 人参根外泌体对多柔比星损伤的 H9C2 细胞线粒体膜电位的影响

Fig. 5 Effect of ginseng root exosomes on doxorubicin-damaged H9C2 cells membrane potential

2.3.8 人参根外泌体对多柔比星诱导的 H9C2 细胞凋亡相关蛋白表达的影响 采用 Western blotting 检测细胞凋亡相关蛋白。细胞处理方法同“2.3.6”项，3000 r/min 离心 5 min 收集细胞，弃去上清，加入适量的 RIPA 裂解液，裂解 4 h，12 000 r/min 离心 30 min，吸取上清用 BCA 蛋白浓度测定试剂盒测定蛋

白浓度后，加入加样缓冲液，在干式恒温器上 95 °C 煮样 5 min，得到蛋白样品。蛋白样品上样 10 μL 经 SDS 聚丙烯酰胺凝胶分离后转至 PVDF 膜上，5% 的脱脂奶粉封闭 1.5 h，加入不同一抗 β-actin (1 : 5000)、Bax (1 : 2000)、Bcl-2 (1 : 1000)、Cyt-C (1 : 1000)，4 °C 孵育过夜，收集一抗，加入辣根过氧化物酶 (HRP) 标记的山羊抗兔/鼠二抗，孵育 1.5 h，在膜上滴加混匀后的 ECL 化学发光液，利用多功能凝胶成像仪显影。

在凋亡过程中，抗细胞凋亡因子 Bcl-2 可阻止线粒体膜孔的开放，而促凋亡调节因子 Bax 诱导其开放，线粒体膜孔开放可促进 Cyt C 从线粒体释放进入细胞质中，从而诱发细胞凋亡。人参根外泌体对多柔比星诱导的线粒体凋亡途径关键蛋白表达的影响见图 6 和表 6。与对照组相比，多柔比星处理后 Bcl-2 表达下降；Bax、胞质 Cyt C 的表达升高。加入人参根外泌体后，随浓度的增加有效地抑制了多柔比星诱导 H9C2 细胞的 Bax 和胞质 Cyt C 表达，增加了 Bcl-2 水平。

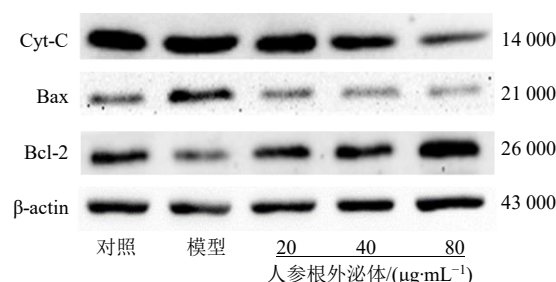


图 6 人参根外泌体对多柔比星损伤的 H9C2 细胞中凋亡相关蛋白表达的影响

Fig. 6 Effect of ginseng root exosomes on expression of apoptosis-related proteins in doxorubicin-injured H9C2 cells

表 6 人参根外泌体对多柔比星损伤的 H9C2 细胞中凋亡相关蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 6 Effect of ginseng root exosomes on expression of apoptosis-related proteins in doxorubicin-injured H9C2 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	质量浓度/($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	Cyt C/ β -actin	Bax/ β -actin	Bcl-2/ β -actin
对照	—	1.00 ± 0.03	1.01 ± 0.02	0.99 ± 0.03
模型	1 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	1.31 ± 0.14 [#]	2.14 ± 0.08 ^{##}	0.65 ± 0.07 ^{##}
给药	20	1.06 ± 0.08	1.32 ± 0.15 [*]	1.03 ± 0.09 [*]
	40	0.85 ± 0.11 ^{**}	0.82 ± 0.21 ^{**}	1.15 ± 0.13 ^{**}
	80	0.35 ± 0.06 ^{***}	0.53 ± 0.09 ^{***}	1.31 ± 0.14 ^{***}

与对照组比较: [#] $P < 0.05$ ^{##} $P < 0.01$; 与模型组比较: ^{*} $P < 0.05$ ^{**} $P < 0.01$ ^{***} $P < 0.001$

[#] $P < 0.05$ ^{##} $P < 0.01$ vs control group; ^{*} $P < 0.05$ ^{**} $P < 0.01$ ^{***} $P < 0.001$ vs model group

3 讨论

多柔比星是一种非常有效和常用的化疗药物,用于治疗恶性肿瘤^[31]。然而在动物研究和临床患者中发现多柔比星可诱发心脏毒性,因此找到能够有效预防和治疗多柔比星诱导心脏毒性的药物是非常必要的。研究发现人参对心血管系统疾病具有很好的治疗效果,但由于其溶解度有限、稳定性差、生物利用度低以及其对细胞的非靶向性等问题,虽然其具有多种生物活性和治疗特性但在临床上的应用受到了限制。过去为了解决这些问题人们利用一些合成载体,如脂质体和纳米载体等用于提高人参的生物利用度。但合成的药物载体具有一定的局限性,其研发成本高、包封率低、使用范围窄等问题还有待解决。本课题试图通过提取人参根外泌体为解决人参的生物利用度问题提供思路。

外泌体是细胞外分泌的纳米囊泡,已有研究证明植物也能分泌外泌体,并在植物细胞间的通讯中发挥重要作用。这些植物来源的外泌体对人类没有已知的潜在毒性,且容易被哺乳动物细胞吸收,介导物种间的交流^[9]。本研究通过差速离心和密度梯度离心等方法成功地从人参根中提取出外泌体,通过透射电子显微镜和 NTA 粒径分析表明这些人参根外泌体具有类似于哺乳动物来源的外泌体的结构,并且含有蛋白质、核酸、sRNA 等胞内成分。利用 H9C2 心肌细胞构建了多柔比星诱导的心肌损伤模型,发现人参根外泌体对其具有明显的保护作用。其作用机制可能是通过保护多柔比星诱导的线粒体相关凋亡途径,减轻多柔比星诱导的心脏毒性。通过 Hoechst 荧光染色发现人参根外泌体给药后多柔比星诱导的细胞形态的变化明显减轻。JC-1 染色观察到多柔比星诱导心肌损伤后线粒体膜电位下降,明显可见绿色 JC-1 单体,加入人参根外泌体后逆转了这一现象。Western blotting 证实了人参根外泌体通过下调 Bax 和上调 Bcl-2 及减少 Cyt C 的释放来减轻多柔比星诱导的心脏毒性,保护心肌细胞损伤。

综上所述,本实验成功提取和鉴定到人参根外泌体,并首次证明了人参根外泌体可以在体外有效改善多柔比星引起的心肌损伤,恢复线粒体膜电位,上调 Bcl-2、下调 Bax 凋亡相关蛋白的表达并减少 Cyt C 的释放。这些发现为多柔比星相关毒性的预防提供了一个新的视角,人参根外泌体作为一种参与哺乳动物心肌保护的调节剂为一类新的纳米药物

在疾病治疗方面提供重要参考。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Dad H A, Gu T W, Zhu A Q, *et al.* Plant exosome-like nanovesicles: Emerging therapeutics and drug delivery nanoplatforms [J]. *Mol Ther*, 2021, 29(1): 13-31.
- [2] Robson A. Exosome-derived microRNAs improve cardiac function [J]. *Nat Rev Cardiol*, 2021, 18(3): 150-151.
- [3] Pan C, Stevic I, Müller V, *et al.* Exosomal microRNAs as tumor markers in epithelial ovarian cancer [J]. *Mol Oncol*, 2018, 12(11): 1935-48.
- [4] Aili Y, Maimaitiming N, Mahemuti Y, *et al.* Liquid biopsy in central nervous system tumors: The potential roles of circulating miRNA and exosomes [J]. *Am J Cancer Res*, 2020, 10(12): 4134-4150.
- [5] Xu X, Liang Y J, Li X F, *et al.* Exosome-mediated delivery of kartogenin for chondrogenesis of synovial fluid-derived mesenchymal stem cells and cartilage regeneration [J]. *Biomaterials*, 2021, 269: 120539.
- [6] Rahimi Ghiasi M, Rahimi E, Amirkhani Z, *et al.* Leucine-rich repeat-containing G-protein coupled receptor 5 gene overexpression of the rat small intestinal progenitor cells in response to orally administered grape exosome-like nanovesicles [J]. *Adv Biomed Res*, 2018, 7: 125.
- [7] Chen X, Zhou Y, Yu J. Exosome-like nanoparticles from ginger rhizomes inhibited NLRP3 inflammasome activation [J]. *Mol Pharm*, 2019, 16(6): 2690-2699.
- [8] Şahin F, Koçak P, Güneş M Y, *et al.* *In vitro* wound healing activity of wheat-derived nanovesicles [J]. *Appl Biochem Biotechnol*, 2019, 188(2): 381-394.
- [9] 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.
- [10] Wang W D, Wang S J, Liu J P, *et al.* Sesquiterpenoids from the root of *Panax ginseng* protect CCl₄-induced acute liver injury by anti-inflammatory and anti-oxidative capabilities in mice [J]. *Biomed Pharmacother*, 2018, 102: 412-419.
- [11] Sreekanth T V M, Nagajyothi P C, Muthuraman P, *et al.* Ultra-sonication-assisted silver nanoparticles using *Panax ginseng* root extract and their anti-cancer and antiviral activities [J]. *J Photochem Photobiol B*, 2018, 188: 6-11.
- [12] Xie J T, Shao Z H, Vanden Hoek T L, *et al.* Antioxidant effects of ginsenoside Re in cardiomyocytes [J]. *Eur J*

- Pharmacol*, 2006, 532(3): 201-207.
- [13] Bai C X, Takahashi K, Masumiya H, *et al*. Nitric oxide-dependent modulation of the delayed rectifier K⁺ current and the L-type Ca²⁺ current by ginsenoside Re, an ingredient of *Panax ginseng*, in Guinea-pig cardiomyocytes [J]. *Br J Pharmacol*, 2004, 142(3): 567-575.
 - [14] Zhu D, Wu L, Li C R, *et al*. Ginsenoside Rg1 protects rat cardiomyocyte from hypoxia/reoxygenation oxidative injury via antioxidant and intracellular calcium homeostasis [J]. *J Cell Biochem*, 2009, 108(1): 117-124.
 - [15] Li J, Yang Y L, Li L Z, *et al*. Succinate accumulation impairs cardiac pyruvate dehydrogenase activity through GRP91-dependent and independent signaling pathways: Therapeutic effects of ginsenoside Rb₁ [J]. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis*, 2017, 1863(11): 2835-2847.
 - [16] Cui Y C, Pan C S, Yan L, *et al*. Ginsenoside Rb1 protects against ischemia/reperfusion-induced myocardial injury via energy metabolism regulation mediated by RhoA signaling pathway [J]. *Sci Rep*, 2017, 7: 44579.
 - [17] Vashisht M, Rani P, Onteru S K, *et al*. Curcumin encapsulated in milk exosomes resists human digestion and possesses enhanced intestinal permeability *in vitro* [J]. *Appl Biochem Biotechnol*, 2017, 183(3): 993-1007.
 - [18] Pilco-Ferreto N, Calaf G M. Influence of doxorubicin on apoptosis and oxidative stress in breast cancer cell lines [J]. *Int J Oncol*, 2016, 49(2): 753-762.
 - [19] Wang A M, Wang W N, Chen Y Q, *et al*. Deguelin induces PUMA-mediated apoptosis and promotes sensitivity of lung cancer cells (LCCs) to doxorubicin (Dox) [J]. *Mol Cell Biochem*, 2018, 442(1/2): 177-186.
 - [20] Vong L B, Nagasaki Y. Combination treatment of murine colon cancer with doxorubicin and redox nanoparticles [J]. *Mol Pharm*, 2016, 13(2): 449-455.
 - [21] Chung W B, Youn H J. Pathophysiology and preventive strategies of anthracycline-induced cardiotoxicity [J]. *Korean J Intern Med*, 2016, 31(4): 625-633.
 - [22] Zagar T M, Cardinale D M, Marks L B. Breast cancer therapy-associated cardiovascular disease [J]. *Nat Rev Clin Oncol*, 2016, 13(3): 172-184.
 - [23] Brown S A, Sandhu N, Herrmann J. Systems biology approaches to adverse drug effects: The example of cardio-oncology [J]. *Nat Rev Clin Oncol*, 2015, 12(12): 718-731.
 - [24] Wang Y, Lei T, Yuan J T, *et al*. GCN₂ deficiency ameliorates doxorubicin-induced cardiotoxicity by decreasing cardiomyocyte apoptosis and myocardial oxidative stress [J]. *Redox Biol*, 2018, 17: 25-34.
 - [25] He Y, Yang Z Y, Li J L, *et al*. Dexmedetomidine reduces the inflammation and apoptosis of doxorubicin-induced myocardial cells [J]. *Exp Mol Pathol*, 2020, 113: 104371.
 - [26] Li S, Mao J, Wang M, *et al*. Comparative proteomic analysis of chief and oxyphil cell nodules in refractory uremic hyperparathyroidism by iTRAQ coupled LC-MS/MS [J]. *J Proteomics*, 2018, 179: 42-52.
 - [27] Panchaprateep R, Pisitkun T, Kalpongkul N. Quantitative proteomic analysis of dermal papilla from male androgenetic alopecia comparing before and after treatment with low-level laser therapy [J]. *Laser Surg Med*, 2019, 51(7): 600-608.
 - [28] Abate M, Festa A, Falco M, *et al*. Mitochondria as playmakers of apoptosis, autophagy and senescence [J]. *Semin Cell Dev Biol*, 2020, 98: 139-153.
 - [29] Sivandzade F, Bhalerao A, Cucullo L. Analysis of the mitochondrial membrane potential using the cationic JC-1 dye as a sensitive fluorescent probe [J]. *Bio Protoc*, 2019, 9(1): e3128.
 - [30] Kalpage H A, Bazylanska V, Recanati M A, *et al*. Tissue-specific regulation of cytochrome C by post-translational modifications: Respiration, the mitochondrial membrane potential, ROS, and apoptosis [J]. *FASEB J*, 2019, 33(2): 1540-1553.
 - [31] Chen C, Jiang L, Zhang M, *et al*. Isodunnanol alleviates doxorubicin-induced myocardial injury by activating protective autophagy [J]. *Food Funct*, 2019, 10(5): 2651-2657.

[责任编辑 郑礼胜]