

• 综述 •

不同来源细胞外囊泡在中药组分高效递送领域中应用的研究进展

王若宁^{1,2}, 张迎洁^{1,2}, 王笑红^{1,2}, 朱安然^{1,2}, 狄留庆^{1,2*}

1. 南京中医药大学药学院, 江苏 南京 210046

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: 细胞外囊泡 (extracellular vesicles, EVs) 是内源性脂质双分子层纳米囊泡, 由内溶酶体途径主动合成并分泌到细胞间隙或系统循环中, 具有高生物相容性、低免疫原性及靶向性等特点。EVs 不仅在细胞间通讯发挥重要作用, 由于其复杂的组成及在健康和疾病中的作用, 其作为治疗手段也越来越受到重视。中药活性成分具有明确的药理作用, 然而其溶解度差、生物利用度低、存在不良反应等缺陷限制了其临床应用, 利用 EVs 作为载体递送中药组分可提高其生物利用度等。通过对不同来源 EVs 的分泌、生物学功能、载药方式及其在多种疾病的药物递送及治疗中的重要应用进行综述, 为 EVs 递送中药组分在临床中的应用提供依据。

关键词: 细胞外囊泡; 植物囊泡; 中药组分; 药物递送; 生物医学功能

中图分类号: R283 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2023)14-4672-10

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2023.14.028

Research progress on extracellular vesicles from different sources in efficient delivery of traditional Chinese medicine components

WANG Ruo-ning^{1,2}, ZHANG Ying-jie^{1,2}, WANG Xiao-hong^{1,2}, ZHU An-ran^{1,2}, DI Liu-qing^{1,2}

1. School of Pharmacy, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210046, China

2. Jiangsu Provincial TCM Engineering Technology Research Center of High Efficient Drug Delivery System, Nanjing 210023, China

Abstract: Extracellular vesicles (EVs) are endogenous lipid bilayer nanovesicles that are actively synthesized by the endolysosomal pathway and secreted into the interstitial space or systemic circulation with high biocompatibility, low immunogenicity, and targeting characteristics. EVs not only play an important role in intercellular communication, they are also gaining attention as therapeutic tools due to their complex composition and role in health and disease. The active ingredients of Chinese medicines have clear pharmacological effects, however, their poor solubility, low bioavailability and the presence of adverse effects limit their clinical application, and the use of EVs as carriers for delivery of Chinese medicine components can improve their bioavailability, etc. By reviewing the secretion, biological functions and drug delivery modes of EVs from different sources and their important applications in drug delivery and treatment of various diseases, we provide a basis for the clinical application of EVs for delivery of herbal components.

Key words: extracellular vesicles; plant-derived extracellular vesicles; traditional Chinese medicine components; drug delivery; biomedical function

细胞外囊泡 (extracellular vesicles, EVs) 是由几乎所有细胞类型释放的纳米级磷脂双层囊泡, 最初由彼得·沃尔夫于 1967 年将其命名为血小板微

尘, 一直被视为细胞废物^[1-2]。然而越来越多的研究表明, EVs 可作为细胞间通信的新兴工具, 并将治疗药物输送到体内靶点。EVs 含有蛋白质、脂质、

收稿日期: 2023-02-10

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (82274104); 国家自然科学基金资助项目 (82074024); 中华中医药学会青年人才托举工程 A 类项目 (2021-QNRC2-A01)

作者简介: 王若宁, 副教授, 从事中药制剂新技术与新剂型。E-mail: ruoningw@njucm.edu.cn

*通信作者: 狄留庆, 教授, 从事中药高效给药系统设计与评价研究。E-mail: diliuqing@njucm.edu.cn

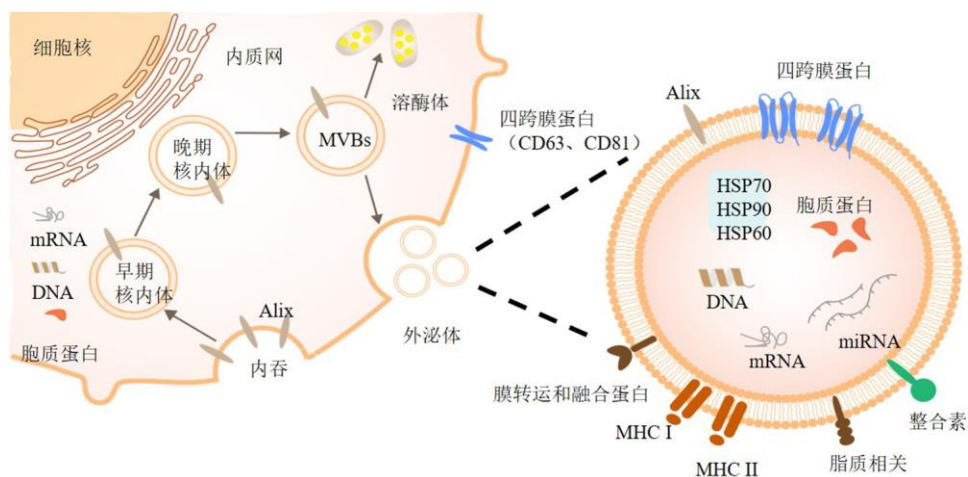
DNA、RNA、氨基酸等生物活性分子，被认为是细胞间通讯的关键介质，在介导信号转导中具有重要作用^[3-4]。EVs 不仅在细胞间通讯发挥重要作用，而且由于其复杂的组成及在疾病中的作用，其作为治疗手段也越来越受到重视^[4-7]。该领域主要集中在从动物细胞和生物体液中分离的 EVs，但越来越多的证据表明，植物细胞也可以释放含有多种功能生物活性分子的 EVs^[8]。大量研究表明在水果、植物中存在囊泡样纳米粒且对疾病有治疗作用，如从葡萄、葡萄柚、生姜和胡萝卜等可食用植物中提取的纳米粒具有抗炎特性^[9-11]。植物来源 EVs (plant-derived EVs, P-EVs) 可以成功将外源性和内源性药物递送到大多数器官的动物细胞中，表明其可作为药物的载体。与合成的递送载体相比，EVs 具有多种优势，可用于根据特定部位调整药物递送系统，减少系统毒性、提高安全性和稳定性；EVs 具有最佳的模拟属性，如高生物相容性、低免疫原性、器官营养性及绕过生物/物理屏障的能力；归巢分子可用于通过表面修饰策略开发合成或混合囊泡样递送纳米平台，以实现靶向药物递送。

随着中医药的发展，中药依靠完整的理论体系在多种疾病治疗方面具有独特的优势。中药活性成

分源于中药，具有明确的药理作用，然而部分中药活性成分的溶解度差、生物利用度低、存在不良反应等限制了其临床应用。因此，寻求一种新型的药物递送载体为提高中药成分利用具有重要作用。本文通过对不同来源 EVs 的分泌、生物学功能、载药方式及其在多种疾病的药物递送及治疗中的重要应用进行综述，为 EVs 递送中药组分在临床中的应用提供依据。

1 EVs 的来源、分泌与提取

EVs 是细胞释放到细胞外的膜结合型囊泡，能够在细胞间运输多种活性分子，逐渐成为细胞间通讯的重要介质。根据其大小和释放机制，分为凋亡小体(直径>1000 nm)、微泡(直径 100~1000 nm)和外泌体(直径<150 nm)^[2-3,9]。凋亡小体是在凋亡后期由垂死的细胞所释放；微泡由质膜外部的排泄或膜的直接出芽产生；而外泌体的形成过程主要包括：(1) 细胞膜内陷形成早期核内体；(2) 核内体分拣复合体调控早期核内体成熟，多个腔内小泡聚集于内泌体腔，腔内小泡不断积累形成多囊泡体(multivesicular bodies, MVBs)；(3) MVBs 成熟后与溶酶体融合以降解溶酶体，或与质膜融合释放腔内小泡到细胞表面形成外泌体，见图 1^[12-13]。



MHC I-主要组织相容性复合物 I Alix-凋亡连接基因-2-相互作用蛋白 X CD63-分化簇 63

MHC I-major histocompatibility complex I Alix-apoptosis-linked gene-2-interacting protein X CD63-cluster of differentiation 63

图 1 外泌体的形成和分泌

Fig. 1 Formation and secretion of exosomes

分离动物来源 EVs 的主要方法有高速离心、梯度高速离心、超滤、共沉淀、尺寸排阻色谱法、场流分离法和免疫富集法等。尽管近年来研究者对 P-EVs 的研究逐渐深入，但仍未有标准化的分离方法。最常见的植物囊泡分离方法是差速离心结合高

速离心法^[14]。原材料的汁液经过几个不同的离心步骤：低速离心去除植物纤维和大颗粒、中速离心去除大的碎片和亚细胞器、高速离心获得 P-EVs 颗粒。然而，通过高速离心获得的 P-EVs 的类型、数量和质量可能受到离心力、转子类型、转子沉降

角、溶液黏度等参数的影响,此外,由于高速离心也会沉淀其他囊泡、蛋白质和蛋白质/RNA 聚集体,因此常与蔗糖密度梯度离心联用分离 P-EVs 与污染物。

通常用于分离纯化动物来源 EVs 的其他方法,如超滤或免疫磁珠法,尚未广泛用于 P-EVs。但也有研究者使用一些新方法分离纯化 P-EVs,如使用外泌体纯化试剂盒,结合沉淀和尺寸排阻色谱法,成功从小麦中分离 EVs^[15]。Yang 等^[16]将电泳技术与相对分子质量 3×10^5 的透析袋相结合成功从柠檬中分离出 P-EVs。

2 EVs 的生物学功能

近年来的研究表明, EVs 携带丰富的脂质、蛋白质、DNA、RNA 等,这些物质在脂质双分子层的保护下,可以相对稳定地存在于细胞外环境。因此,其不仅能作用于邻近细胞,还可以通过体液运输进入远端的靶细胞,发挥生理和病理信号载体的功能,实现细胞内/间物质传递与信息交流^[17-18]。EVs 参与许多重要的细胞过程,包括促进细胞侵袭、细胞生长、逃避免疫反应、刺激血管生成和耐药等,其所携带的 DNA、mRNA 等物质还与多种疾病的发病机制密切相关,因此有望被开发为用于癌症早期诊疗、检测疾病进展和指导个性化治疗的生物标志物^[19]。

EVs 的生物学功能与其供体细胞密切相关。不同细胞来源的 EVs,如间充质干细胞、T 细胞、B 细胞、巨噬细胞、树突状细胞(dendritic cells, DCs)等释放的 EVs,影响先天和适应性免疫系统中受体细胞的增殖和活性。DCs 分泌的 EVs (DCs-derived EVs, D-EVs),无论其是否成熟,在培养过程中都会促进辅助 T 细胞的应答反应产生 γ -干扰素。Perez 等^[20]研究表明, D-EVs 表面携带的 MHC 分子具有抗原递呈能力,参与免疫调节。此外, D-EVs 也可作为抗癌药物的载体。从小鼠未成熟 DCs 中提取的 EVs 作为药物载体包载阿霉素,可抑制小鼠实体瘤生长,且无明显毒性^[21]。巨噬细胞来源的 EVs 可以产生 α -干扰素、 γ -干扰素、肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)及白细胞介素(interleukin, IL),促进 CD4⁺和 CD8⁺ T 细胞的成熟,同时也可调控巨噬细胞产生 IL^[22]。肿瘤细胞源性 EVs 具有肿瘤归巢特性,使其成为预防、诊断和治疗癌症的理想候选载体及诊断与监测肿瘤的生物标志物^[23-25]。

P-EVs 中提取分离出的脂质表明, P-EVs 含有

的 2 个主要脂质类别是磷脂和甘油。P-EVs 富含脂质,包括磷脂酸、磷脂酰胆碱、磷脂酰乙醇胺等。不同来源的 P-EVs 中脂质的组成和含量不同。P-EVs 作为一种药物载体,脂质对其功能发挥具有一定的影响,尤其是对靶向能力的影响。富含磷脂酸的姜来源 EVs 向鼠李糖乳杆菌发送信号时,被鼠李糖乳杆菌优先摄取,其含有的磷脂酸对肠道中 EVs 积累也有一定影响^[24]。葡萄柚中的磷脂酰胆碱可促进其 EVs 被瘤胃球菌科吸收,增强 EVs 从肠道到肝脏的转移^[26]。

除脂质外, P-EVs 富含大量的蛋白质。一些通道蛋白、酶蛋白和热休克蛋白(heat shock proteins, HSP)存在于 P-EVs 的膜表面或膜中。不同植物的 P-EVs 的蛋白质含量差异较大。拟南芥衍生 EVs 富含参与生物和非生物胁迫反应的蛋白质^[27]。质谱分析表明,葡萄衍生 P-EVs 含有调节碳水化合物或脂质代谢的蛋白质和通道蛋白^[28]。从生姜中提取的 EVs 含有少量蛋白质,主要是细胞质蛋白,包括肌动蛋白和蛋白水解酶。此外,还有一些与运输相关的膜蛋白^[29]。虽然不同 P-EVs 的蛋白质并不完全相同,但在大多数 P-EVs 中仍然存在一些相同的蛋白质。如柑橘、姜和葡萄来源的 P-EVs 均含有网格蛋白重链、HSP 和水通道蛋白等。此外, P-EVs 还富含 RNA,主要是 microRNA (miRNA)。Xiao 等^[30]从 11 种可食用水果和蔬菜中(柑橘、豌豆、猕猴桃、哈密瓜等)分离出 P-EVs,并对相应的 miRNA 文库进行 Illumina 测序,共鉴定出 418 种 miRNA。靶点预测和功能分析表明,miRNA 的高表达与炎症反应和肿瘤相关途径密切相关。

3 EVs 作为药物递送载体的应用

3.1 EVs 作为药物递送载体的优势

EVs 是细胞自身分泌的微小囊泡,参与细胞间物质与信息的交换,在健康保护和疾病治疗中具有重要作用,包括发育、免疫、维持组织稳态等过程及在癌症和中枢神经系统(central nervous system, CNS)疾病等治疗中。大量研究表明, EVs 作为药物递送载体有着巨大的优势^[19,31-35]。(1) EVs 具有稳定性、较长的循环半衰期和良好的安全性,能够将药物以最小毒性的方式递送到靶细胞或靶组织。此外, EVs 可以通过受体介导的内吞及巨胞饮等方式透过血脑屏障^[11]。(2) EVs 具有天然的靶向能力,不同细胞来源的 EVs 靠受体载体的相互作用和表面的黏附蛋白选择性靶向受体细胞,且 EVs 的粒径较

小, 利用肿瘤部位的高通透性和滞留效应, 可使其在肿瘤部位滞留, 从而实现靶向性。与脂质体相比, 二者的基本组分都是磷脂, 但是 EVs 是由各种脂质和表面蛋白混合而成, 其中一些成分有助于提高组织靶向性, 其他成分则确保较小的非特异性相互作用^[36-37]。且作为药物运输载体, EVs 不仅发挥运输药物的功能, 其本身及其所含有的内容物如 mRNA 和脂质等生物活性分子也会协同发挥治疗作用从而达到更好的治疗效果^[38]。(3) EVs 具有磷脂双分子层结构, 可以包封疏水和亲水药物, 显著提高包封率, 改善某些 RNA、化疗药物的稳定性差、溶解度差等问题^[39]。EVs 能够绕过补体因子的激活, 从而保护其药物的有效载荷不被清除, 即逃避免疫系统的识别和清除。因此, EVs 作为一种天然的载体系统, 具有免疫原性低、生物相容性高、靶向性强等特点, 易跨越生理病理屏障, 并在长期储存过程中保持高活性, 使其成为一种理想的药物递送系统。

3.2 EVs 的载药方式

EVs 载药包括对内源性和外源性药物的包载。

内源性包载针对特定的细胞系, 将药物与细胞共培养使所需的分子结合到 EVs 中。这种方式一般只用于细胞内可自然产生的蛋白质、核酸和小分子物质的包载, 后续需要进一步分离纯化。内源性包载分为被动和主动载药, 前者基于所需分子在细胞中的过表达, 并依赖于这些分子在 EVs 中的被动捕获; 后者基于细胞的分类识别机制, 可以主动选择性地包载药物^[32-33]。外源性药物多采用被动包载的方式, 被动载药通常将药物或分子直接与 EVs 或 EVs 的供体细胞孵育。疏水性小分子可以通过共孵育方式被动进入外泌体脂质双分子层, 且疏水性药物的浓度对载药效率起决定性作用。但由于其非靶向性, 可能会导致 EVs 产量低、载药量有限。常见的提高载药效率的主动载药方式有电穿孔、超声、挤压、冻融循环等。此外, 还可以通过膜通透性剂和表面活性剂(如皂苷)与 EVs 膜中的胆固醇相互作用形成孔隙, 以增加载药效率, 然而皂苷的溶血作用可能限制其应用^[34-35,40-42]。不同载药方式的优缺点总结见表 1。

表 1 不同载药方式的优点和缺点

Table 1 Advantages and disadvantages of different drug loading methods

载药方式	优点	缺点	文献
皂苷透化	载药效率高	对血细胞有溶血作用、毒性	34
电穿孔	载药效率高	药物过度聚集、破坏外泌体完整性	35
超声	载药效率高	破坏外泌体完整性、核酸聚集	40
挤压	外泌体产率高、载药效率高	细胞毒性、改变外泌体完整性	41
冻融循环	载药效率中等	蛋白质变性	42
共孵育	简单、不损害膜完整性	载药效率低、细胞毒性、特异性差	43

4 EVs 在中药组分递送中的应用

EVs 可作为靶向纳米平台用于药物递送治疗多种疾病^[25]。利用 EVs 来源的生物标志物进行疾病的检测, 是一种准确、无创且效益高的诊断方法。EVs 表面的肿瘤特异性抗原具有良好的抗原免疫原性, 已被用于开发癌症疫苗和生产单克隆抗体。EVs 的脂质双分子层允许疏水性和亲水性药物的负载, 实现高效递送^[39,44]。

4.1 肿瘤相关疾病

姜黄素是中药温郁金的有效成分之一, 具有抗炎、抗氧化应激和抑制恶性肿瘤细胞增殖的作用。Osterman 等^[45-46]研究表明, 在姜黄素处理的胰腺癌细胞分离的外泌体中已被证明有姜黄素的存在。姜黄素可通过外泌体递送到受体胰腺癌细胞, 下调与

癌症进展相关的转录因子, 包括核因子- κ B 和信号转导和转录激活因子 3, 导致下游生存靶点的消耗, 促进细胞毒性, 降低细胞活力, 降低凋亡抑制剂 (inhibitor of apoptosis, IAP) 存活素、cIAP1、cIAP2 和 XIAP 在胰腺癌细胞的蛋白和 mRNA 水平上诱导凋亡细胞死亡。

雷公藤内酯 (triptolide, TP) 是雷公藤的主要活性成分。具有免疫抑制、抗炎、抗肿瘤等活性, 在体外可以抑制各类癌细胞的增殖, 抑制实体瘤在体内的生长和转移。但 TP 溶解性较差, 而且可能导致严重的生殖系统、肝和肾毒性^[47-49], 阻碍 TP 在卵巢癌治疗中的潜在临床应用。Liu 等^[50]通过高速离心和超滤离心收集人卵巢癌 SKOV3 细胞-外泌体 (SKOV3-exosomes, SK-Exos), 构建负载雷公

藤内酯的外泌体递送系统 Exos-TP, 其负载率较高、可将药物有效地递送至靶细胞并减弱 TP 的毒性。喜树碱作为一种可逆的拓扑异构酶抑制剂, 可限制 DNA 的合成, 但由于其不溶于水和较强的毒副作用, 限制了其临床使用。Malhotra 等^[51]使用红细胞膜来源的囊泡, 负载疏水性药物喜树碱, 其稳定性和基本结构特征保持不变, 且具有较高包封率, 24 h 内喜树碱表现出较慢的释放和较强的保留。

纳米 EVs 不容易被巨噬细胞吞噬, 因此具有更长的循环时间且不被宿主免疫系统所识别。该体系对喜树碱和 CM-Dil 在 24 h 内分别表现出较慢的释放和较强的保留; EVs 被人肺癌 A549 细胞内化后, 可诱导肺癌细胞凋亡, 毒性略高于游离喜树碱; 在体内有应用潜力, 在血液中的滞留率超过 48 h。

化疗药物紫杉醇也可被 EVs 包载显著提高其治疗效果。Zhu 等^[52]通过高速离心法从胚胎干细胞 (embryonic stem cells, ESC) 分离外泌体 ESC-Exos, 制备了带有巯基的 RGD 环肽修饰和紫杉醇负载的 ESC-Exos (cRGD-Exos-PTX), cRGD-Exos-PTX 可通过增强靶向性显著提高紫杉醇治疗胶质瘤的疗效。将紫杉醇和吉西他滨单磷酸负载于骨髓间充质干细胞来源的外泌体内, 可以增加药物在肿瘤部位的聚集能力, 克服胰腺导管腺癌的耐药性, 产生良好的体内外抗癌效果。

4.2 CNS 疾病

中药及其有效成分可作为治疗 CNS 疾病的潜在新药。Zhang 等^[53]发现石菖蒲挥发油可降低 α -突触核蛋白水平并抑制自噬激活治疗帕金森病 (Parkinson's disease, PD)。在慢性不可预测应激动物模型中, 人参皂苷 Rg₃ (ginsenoside Rg₃, Rg₃) 可通过减少促肾上腺皮质激素释放激素、皮质酮和促肾上腺皮质激素的产生, 抑制下丘脑-垂体-肾上腺轴过度激活, 从而发挥抗焦虑和抗抑郁作用^[54]。内源性神经干细胞的激活可以实现梗死神经元的替换, 促进神经网络的再生, Rg₁、黄芪甲苷、淫鼠藿苷、丹酚酸 B、白藜芦醇、姜黄素、青蒿琥酯和银杏内酯 B 可通过不同的信号通路和分子激活内源性神经干细胞^[55]。阿尔茨海默病 (Alzheimer's disease, AD) 是最常见的 CNS 疾病, 发病原因可能是脑实质和血管中的 β -淀粉样蛋白 (β -protein, A β) 积累导致血管完整性受损和清除受损。使用小鼠脑神经瘤 Neuro-2A 细胞来源的外泌体分别包封 5 种潜在的神经保护天然化合物黄芩苷

(baicalin, BA)、常春藤皂苷元 (hederagenin, Hed)、甲基莲心碱 (neferine, Nef)、Rg₃ 和雷帕霉素 (rapamycin, Rapa), 分别得到化合物 Exos-BA、Exos-Hed、Exos-Nef、Exos-Rg₃ 和 Exos-Rapa, 可增强其透过血脑屏障的渗透性, 且有更高的生物有效性^[56]。与单独化合物相比, Exos-BA、Exos-Hed 和 Exos-Nef 可降低突变蛋白 HTT74、P301L tau 和 A53T α -突触核蛋白的水平, 促进突变蛋白在细胞中的自噬降解。此外, Exos-Nef 可改善淀粉样前体蛋白/早老素基因 1 双转基因小鼠的运动协调的程度, 降低原纤维化 A β 水平。槲皮素 (quercetin, Que) 在治疗 AD 时, 可通过改善认知功能, 预防 tau 蛋白病理变化, 诱导神经保护作用。然而, 由于其脑靶向性和生物利用度较差, 临床应用受到限制。Qi 等^[57]用血浆外泌体包载槲皮素 Exos-Que, 可改善槲皮素的脑靶向性, 并显著提高槲皮素的生物利用度。此外, 与游离槲皮素相比, Exos-Que 通过抑制细胞周期蛋白依赖性激酶介导的 tau 磷酸化和减少不溶性神经纤维缠结的形成, 从而更好地缓解 AD 的症状, 显示其治疗 AD 的潜力。有研究表明水飞蓟素 (silibinin, Silb) 在降低 A β 聚集和使星形胶质细胞失活, 改善 AD 患者的行为和认知方面具有双重治疗作用。Huo 等^[58]将 Silb 包裹在 M ϕ 源性外泌体 (Exos-Silb) 中, 当该复合物进入大脑后, Exos-Silb 可选择性地与 A β 单体相互作用, 并减少其聚集。同时, Exos-Silb 在星形胶质细胞中被内化, 抑制其激活, 减轻星形胶质细胞炎症介导的神经元损伤, 进而改善 AD 小鼠的认知缺陷。

表儿茶素没食子酸盐 (epicatechin gallate, ECG) 是药效最好的儿茶素成分之一, 在体内外对神经元都具有良好的神经保护作用, 减少 AD 和 PD 的发生。然而由于 ECG 稳定性和肠道渗透性较差, 可能影响体内循环期间的生物利用度。Luo 等^[59]设计了一种新的基于 Exos 的 ECG 递送系统, 从新鲜牛乳中分离得到 Exos, 采用超声法将 ECG 包载于 EVs 中, 得到 Exos-ECG, 其人神经母细胞瘤 SHSY5Y 细胞具有神经保护作用。BA 是一种强大的自由基清除剂, 在缺血性脑卒中的治疗中可发挥神经保护作用。但由于其不能靶向脑组织、溶解性差, 使得临床应用受到限制。Huang 等^[60]设计的 Exos-BA 在短暂性大脑中动脉闭塞/再灌注模型和永久性大脑中动脉闭塞模型中, Exos-BA 比游离 BA 表现出更好的脑靶向性。Exos-BA 可显著减少活性氧的生成,

提高超氧化物歧化酶和谷胱甘肽过氧化物酶的活性。改善 BA 在动物模型大脑中的溶解度和积累,减少脑梗死体积、减轻神经功能缺损程度、提高神经元存活率,并激活了神经元中的核因子 E2 相关因子 2/血红素加氧酶-1 通路,从而显著减轻卒中模型中的脑缺血损伤。

4.3 炎症

脂多糖诱导的脓毒性休克的特征之一是隔离在肺部的 CD11b⁺Gr-1⁺细胞数量的急剧增加,导致急性肺部炎症。姜黄素与外泌体复合物治疗的小鼠对脂多糖诱导的感染性休克具有保护作用,且可以降低炎症因子 IL-6 和 TNF- α 的水平^[61]。姜黄素与外泌体复合物可减少小鼠肺中 CD11b⁺Gr-1⁺细胞数量,增加姜黄素向激活的单核细胞的传递,从而增强其抗炎活性。

5 P-EVs 的生物活性与作为载体的应用

除了蛋白质、核酸、脂质和其他常见成分外,P-EVs 中还包括植物特有的活性成分。在作为载体进行运输时,可实现活性成分的共同运输。如从人参中分离并鉴定的一种新型人参 EVs 样纳米粒(ginseng-derived nanoparticles, GDNPs),通过电喷雾离子化扫描检测到 GDNPs 中 Rg₃ 的含量较高^[62]。GDNPs 作为一种免疫增强剂显著促进巨噬细胞 M₂ 向 M₁ 表型的极化,产生活性氧,导致小鼠黑色素瘤细胞凋亡增加,抑制荷瘤小鼠黑色素瘤的生长。GDNPs 诱导的 M₁ 极化依赖于 Toll 样受体 4 和髓系分化抗原 88 介导的信号传导;GDNPs 的神经酰胺脂质和蛋白质可能通过 Toll 样受体 4 的激活在巨噬细胞极化中发挥重要作用。Man 等^[63]通过研究姜来源 P-EVs 的活性成分,发现姜来源的 EVs 中含有 6-姜辣素、8-姜辣素和 10-姜辣素等,这些姜辣素可以从囊泡输送到大鼠的肠道并被吸收,不同肠道吸收趋势为十二指肠>空肠>回肠。表明姜来源 EVs 具有良好的载药性能,作为药物传递系统的载体具有重要的应用前景。同时,结合 3 种姜酚化合物的油水分配系数,推测姜来源 EVs 的负载量与其脂溶性呈正相关。Perut 等^[64]从草莓中提取的 EVs 中检测到丰富的维生素 C,且显示出强烈的抗氧化作用。

芦丁是一种类黄酮植物化学成分,可以清除活性氧,减少促炎因子的产生^[65]。已有研究证明在脊髓损伤的大鼠模型中芦丁可以通过抑制 p38 丝裂原活化蛋白激酶和减轻氧化应激,减轻脊髓损伤^[66]。然而,低溶解度、低生物利用度和快速清除限制了

其应用。从槐米浸出液中提取得到含有芦丁的槐米来源的外泌体(*Flos Sophorae Immaturus* derived exosomes, so-Exos),将 so-Exos 封装在聚多巴胺修饰的水凝胶中,构建了用于脊髓损伤治疗的局部植入系统,并通过高效液相色谱证明 so-Exos 中芦丁的存在^[67]。外泌体的持续释放可以改善周围有害的活性氧微环境:(1)在低氧条件下,改善细胞损伤;(2)外泌体可被神经细胞内化,刺激其再生,促进其对氧化损伤的耐受性;(3)实现脊髓损伤后神经再生和运动功能的快速恢复,显著改善运动系统;(4)降低大鼠脊髓横断后并发症——尿潴留程度。

基于目前的研究,运输的药物多为化学药,因此需要大量研究来探索 P-EVs 在运输中药组分方面的应用。从葡萄、葡萄柚、生姜和胡萝卜来源提取的纳米粒还具有抗癌特性。葡萄柚是一种用于纳米药物的递送的植物性食物来源。Wang 等^[68]研究表明,葡萄柚衍生纳米载体在递送治疗剂方面疗效显著,从葡萄柚来源的 EVs 中提取脂质并用叶酸进行修饰制备工程脂质载体,该载体可以携带化学药、蛋白质和核酸等。且该工程化脂质载体具有体内靶向特异性,且安全性良好。此外,将甲氨蝶呤加载到葡萄柚衍生 EVs 中可以减少甲氨蝶呤的不良反应并增强抗结肠炎的作用。Niu 等^[69]将载有阿霉素的肝素基纳米颗粒偶联到葡萄柚衍生的 EVs 表面,基于 EVs 上各种细胞膜蛋白质的存在,可以穿过血脑屏障,达到治疗胶质瘤的目的。

生姜是使用最广泛的天然产品之一,具有抗氧化、抗菌、抗炎和抗癌等作用。Zhang 等^[70]从生姜中分离脂质并重组制备大量姜衍生纳米粒(ginger-derived nanovectors, GDNVs),且发现 GDNVs 可被肠癌细胞有效吸收,高效负载阿霉素后通过靶向叶酸配体实现对结肠癌的积极靶向。表明 GDNVs 在药物载体方面的巨大潜力,有望开发为一种新的口服给药系统。Zhang 等^[71]研究表明,GDNVs 被巨噬细胞和肠上皮细胞摄取后能够维持肠道内稳态,增加抗炎细胞因子 IL-10 和 IL-12 表达,降低促炎因子 IL-6、TNF- α 等表达。且在不同的小鼠结肠炎模型,GDNVs 可减少急性结肠炎,增加肠道修复,并抑制慢性结肠炎和结肠炎。

6 结语与展望

EVs 由于其高生物相容性、低免疫原性及易通过生理屏障等特点,越来越多地被用于中药组分的体内递送。尽管 EVs 在药物递送与疾病治疗方面具

有广泛的应用前景,但仍有一些问题。(1) EVs 作为生物标志物,对其灵敏而特异的检测仍有待研究。(2) 开发更为高效、便捷的 EVs 分离技术以获得高纯度的外泌体仍是一大难题。EVs 的分离技术繁琐,且获得的 EVs 具有异质性,在大小、相对分子质量等特性间的差异影响 EVs 的治疗性能。分离得到的 EVs 整体组成和囊泡内容物的成分组成和作用机制尚未完全清楚,导致 EVs 难以应用于临床。且保持 EVs 完整性的最佳储存条件(如温度或 pH 值)较为苛刻。(3) 作为药物靶向载体,优化出更为高效的药物加载方式是保证治疗成功的关键所在^[36]。P-EVs 具有来源广泛、产量大和安全性高等优势,但是目前关于 P-EVs 作为治疗剂和载体的研究较少,关于 P-EVs 及其所携带的 RNA、蛋白质等成分发挥作用的机制尚不明确。综上所述,进一步了解与开发 EVs 作为中药组分递送载体在疾病中的应用可为临床应用提供参考。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Shi X F, Wang B, Feng X R, *et al.* circRNAs and exosomes: A mysterious frontier for human cancer [J]. *Mol Ther Nucleic Acids*, 2020, 19: 384-392.
- [2] Kang X H, Zuo Z Y, Hong W D, *et al.* Progress of research on exosomes in the protection against ischemic brain injury [J]. *Front Neurosci*, 2019, 13: 1149.
- [3] Xie F, Zhou X X, Fang M Y, *et al.* Extracellular vesicles in cancer immune microenvironment and cancer immunotherapy [J]. *Adv Sci*, 2019, 6(24): 1901779.
- [4] Kalluri R, LeBleu V S. The biology, function, and biomedical applications of exosomes [J]. *Science*, 2020, 367(6478): eaau6977.
- [5] Pegtel D M, Gould S J. Exosomes [J]. *Annu Rev Biochem*, 2019, 88: 487-514.
- [6] Mrowczynski O D, Zacharia B E, Connor J R. Exosomes and their implications in central nervous system tumor biology [J]. *Prog Neurobiol*, 2019, 172: 71-83.
- [7] Li S P, Lin Z X, Jiang X Y, *et al.* Exosomal cargo-loading and synthetic exosome-mimics as potential therapeutic tools [J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2018, 39(4): 542-551.
- [8] Lu M, Huang Y Y. Bioinspired exosome-like therapeutics and delivery nanoplatfoms [J]. *Biomaterials*, 2020, 242: 119925.
- [9] Tran P H L, Xiang D X, Tran T T D, *et al.* Exosomes and nanoengineering: A match made for precision therapeutics [J]. *Adv Mater*, 2020, 32(18): e1904040.
- [10] Armstrong J P K, Holme M N, Stevens M M. Re-engineering extracellular vesicles as smart nanoscale therapeutics [J]. *ACS Nano*, 2017, 11(1): 69-83.
- [11] Shi M, Sheng Li F, Stewart T, *et al.* New windows into the brain: Central nervous system-derived extracellular vesicles in blood [J]. *Prog Neurobiol*, 2019, 175: 96-106.
- [12] Xiao X H, Wang Y, Huang Y L, *et al.* Exosomal miRNAs in central nervous system diseases: Biomarkers, pathological mediators, protective factors and therapeutic agents [J]. *Prog Neurobiol*, 2019, 183: 101694.
- [13] Balusu S, Wouterghem E V, Rycke R D, *et al.* Identification of a novel mechanism of blood-brain communication during peripheral inflammation via choroid plexus-derived extracellular vesicles [J]. *EMBO Mol Med*, 2016, 8(10): 1162-1183.
- [14] Wei H, Xu Y H, Chen Q, *et al.* Mesenchymal stem cell-derived exosomal miR-223 regulates neuronal cell apoptosis [J]. *Cell Death Dis*, 2020, 11(4): 290.
- [15] 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.
- [16] Yang M, Liu X Y, Luo Q Q, *et al.* An efficient method to isolate lemon derived extracellular vesicles for gastric cancer therapy [J]. *J Nanobiotechnol*, 2020, 18(1): 100.
- [17] Patil M, Henderson J, Luong H, *et al.* The art of intercellular wireless communications: Exosomes in heart disease and therapy [J]. *Front Cell Dev Biol*, 2019, 7: 315.
- [18] Das A, Mohan V, Krishnaswamy V R, *et al.* Exosomes as a storehouse of tissue remodeling proteases and mediators of cancer progression [J]. *Cancer Metastasis Rev*, 2019, 38(3): 455-468.
- [19] Kishore R, Khan M. More than tiny sacks: Stem cell exosomes as cell-free modality for cardiac repair [J]. *Circ Res*, 2016, 118(2): 330-343.
- [20] Perez C. R, Palma M D. Engineering dendritic cell vaccines to improve cancer immunotherapy [J]. *Nat Commun*, 2019, 10(1): 1-10.
- [21] Sedgwick A E, D'Souza-Schorey C. The biology of extracellular microvesicles [J]. *Traffic*, 2018, 19(5):

- 319-327.
- [22] Chen L, Wang L, Zhu L L, *et al.* Exosomes as drug carriers in anti-cancer therapy [J]. *Front Cell Dev Biol*, 2022, 10: 728616.
- [23] Thomas S C, Kim J W, Pauletti G M, *et al.* Exosomes: Biological pharmaceutical nanovectors for theranostics [J]. *Front Bioeng Biotechnol*, 2022, 9: 808614.
- [24] Gutierrez-Millan C, Díaz C C, Lanao J M, *et al.* Advances in exosomes-based drug delivery systems [J]. *Macromol Biosci*, 2021, 21(1): e2000269.
- [25] Scavo M P, Depalo N, Tutino V, *et al.* Exosomes for diagnosis and therapy in gastrointestinal cancers [J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(1): 367.
- [26] 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.
- [27] Rutter B D, Innes R W. Extracellular vesicles isolated from the leaf apoplast carry stress-response proteins [J]. *Plant Physiol*, 2017, 173(1): 728-741.
- [28] 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(7), 1345-1357.
- [29] Martínez-Ballesta M D C, García-Gomez P, Yepes-Molina L, *et al.* Plasma membrane aquaporins mediates vesicle stability in broccoli [J]. *PLoS One*, 2018, 13(2): e0192422.
- [30] Xiao J, Feng S Y, Wang X, *et al.* Identification of exosome-like nanoparticle-derived microRNAs from 11 edible fruits and vegetables [J]. *Peer J*, 2018, 6: e5186.
- [31] Holm M M, Kaiser J, Schwab M E, *et al.* Extracellular vesicles: Multimodal envoys in neural maintenance and repair [J]. *Trends Neurosci*, 2018, 41(6): 360-372.
- [32] Ingato D, Lee J U, Sim S J, *et al.* Good things come in small packages: Overcoming challenges to harness extracellular vesicles for therapeutic delivery [J]. *J Control Release*, 2016, 241: 174-185.
- [33] Kooijmans S A A, Schiffelers R M, Zarovni N, *et al.* Modulation of tissue tropism and biological activity of exosomes and other extracellular vesicles: New nanotools for cancer treatment [J]. *Pharmacol Res*, 2016, 111: 487-500.
- [34] Liu H M, Deng S C, Han L, *et al.* Mesenchymal stem cells, exosomes and exosome-mimics as smart drug carriers for targeted cancer therapy [J]. *Colloids Surf B Biointerfaces*, 2022, 209: 112163.
- [35] Massey A E, Malik S, Sikander M, *et al.* Clinical implications of exosomes: Targeted drug delivery for cancer treatment [J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(10): 5278.
- [36] 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.
- [37] Hoppstädter J, Dembek A, Linnenberger R, *et al.* Toll-like receptor 2 release by macrophages: An anti-inflammatory program induced by glucocorticoids and lipopolysaccharide [J]. *Front Immunol*, 2019, 10: 1634.
- [38] Xu X H, Yuan T J, Dad H A, *et al.* Plant exosomes as novel nanoplatforms for microRNA transfer stimulate neural differentiation of stem cells *in vitro* and *in vivo* [J]. *Nano Lett*, 2021, 21(19): 8151-8159.
- [39] Batrakova E V, Kim M S. Using exosomes, naturally-equipped nanocarriers, for drug delivery [J]. *J Control Release*, 2015, 219: 396-405.
- [40] Wang J, Chen D, Ho E A, *et al.* Challenges in the development and establishment of exosome-based drug delivery systems [J]. *J Control Release*, 2021, 329: 894-906.
- [41] Butreddy A, Kommineni N, Dudhipala N. Exosomes as naturally occurring vehicles for delivery of biopharmaceuticals: Insights from drug delivery to clinical perspectives [J]. *Nanomaterial*, 2021, 11(6): 1481.
- [42] Huda M N, Nafiujjaman M, Deaguero I G, *et al.* Potential use of exosomes as diagnostic biomarkers and in targeted drug delivery: Progress in clinical and preclinical applications [J]. *ACS Biomater Sci Eng*, 2021, 7(6): 2106-2149.
- [43] Zhang X, Zhang H B, Gu J M, *et al.* Engineered extracellular vesicles for cancer therapy [J]. *Adv Mater*, 2021, 33(14): e2005709.
- [44] Skog J, Würdinger T, van Rijn S V, *et al.* Glioblastoma microvesicles transport RNA and proteins that promote tumour growth and provide diagnostic biomarkers [J]. *Nat Cell Biol*, 2008, 10(12): 1470-1476.
- [45] Osterman C J D, Lynch J C, Leaf P, *et al.* Curcumin modulates pancreatic adenocarcinoma cell-derived exosomal function [J]. *PLoS One*, 2015, 10(7): e0132845.
- [46] Osterman C J D, Gonda A, Stiff T, *et al.* Curcumin

- induces pancreatic adenocarcinoma cell death via reduction of the inhibitors of apoptosis [J]. *Pancreas*, 2016, 45(1): 101-109.
- [47] Liu J, Jiang Z Z, Liu L, *et al.* Triptolide induces adverse effect on reproductive parameters of female Sprague-Dawley rats [J]. *Drug Chem Toxicol*, 2010, 34(1): 1-7.
- [48] Fu Q, Huang X, Shu B, *et al.* Inhibition of mitochondrial respiratory chain is involved in triptolide-induced liver injury [J]. *Fitoterapia*, 2011, 82(8): 1241-1248.
- [49] Yang F, Ren L, Zhou L, *et al.* Involvement of oxidative stress in the mechanism of triptolide-induced acute nephrotoxicity in rats [J]. *Exp Toxicol Pathol*, 2012, 64(7/8): 905-911.
- [50] Liu H, Shen M, Zhao D, *et al.* The effect of triptolide-loaded exosomes on the proliferation and apoptosis of human ovarian cancer SKOV3 cells [J]. *Biomed Res Int*, 2019, 2019: 2595801.
- [51] Malhotra S, Dumoga S, Sirohi P, *et al.* Red blood cells-derived vesicles for delivery of lipophilic drug camptothecin [J]. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2019, 11(25): 22141-22151.
- [52] Zhu Q W, Ling X Z, Yang Y L, *et al.* Embryonic stem cells-derived exosomes endowed with targeting properties as chemotherapeutics delivery vehicles for glioblastoma therapy [J]. *Adv Sci*, 2019, 6(6): 1801899.
- [53] Zhang S, Gui X H, Huang L P, *et al.* Neuroprotective effects of B-asarone against 6-hydroxy dopamine-induced parkinsonism via JNK/Bc-2/Beclin-1 pathway [J]. *Mol Neurobiol*, 2016, 53(1): 83-94.
- [54] Xu J N, Chen L F, Su J, *et al.* The anxiolytic-like effects of ginsenoside Rg₃ on chronic unpredictable stress in rats [J]. *Sci Rep*, 2018, 8(1): 7741.
- [55] Wang J, Hu J, Chen X Z, *et al.* Traditional Chinese medicine monomers: Novel strategy for endogenous neural stem cells activation after stroke [J]. *Front Cell Neurosci*, 2021, 15: 628115.
- [56] Tang B, Zeng W, Song L L, *et al.* Extracellular vesicle delivery of neferine for the attenuation of neurodegenerative disease proteins and motor deficit in an Alzheimer's disease mouse model [J]. *Pharmaceuticals*, 2022, 15(1): 83.
- [57] Qi Y, Guo L, Jiang Y B, *et al.* Brain delivery of quercetin-loaded exosomes improved cognitive function in AD mice by inhibiting phosphorylated tau-mediated neurofibrillary tangles [J]. *Drug Deliv*, 2020, 27(1): 745-755.
- [58] Huo Q H, Shi Y J, Qi Y, *et al.* Biomimetic silibinin-loaded macrophage-derived exosomes induce dual inhibition of A β aggregation and astrocyte activation to alleviate cognitive impairment in a model of Alzheimer's disease [J]. *Mater Sci Eng C*, 2021, 129: 112365.
- [59] Luo S Q, Sun X L, Huang M, *et al.* Enhanced neuroprotective effects of epicatechin gallate encapsulated by bovine milk-derived exosomes against Parkinson's disease through antiapoptosis and antimetaphagy [J]. *J Agric Food Chem*, 2021, 69(17): 5134-5143.
- [60] Huang Z X, Guo L, Huang L J, *et al.* Baicalin-loaded macrophage-derived exosomes ameliorate ischemic brain injury via the antioxidative pathway [J]. *Mater Sci Eng C*, 2021, 126: 112123.
- [61] Sun D M, Zhuang X Y, Xiang X Y, *et al.* A novel nanoparticle drug delivery system: The anti-inflammatory activity of curcumin is enhanced when encapsulated in exosomes [J]. *Mol Ther*, 2010, 18(9): 1606-1614.
- [62] Cao M, Yan H J, Han X, *et al.* Ginseng-derived nanoparticles alter macrophage polarization to inhibit melanoma growth [J]. *J Immunother Cancer*, 2019, 7(1): 326.
- [63] Man F L, Meng C, Liu Y, *et al.* The study of ginger-derived extracellular vesicles as a natural nanoscale drug carrier and their intestinal absorption in rats [J]. *AAPS PharmSciTech*, 2021, 22(6): 206.
- [64] Perut F, Roncuzzi L, Avnet S, *et al.* Strawberry-derived exosome-like nanoparticles prevent oxidative stress in human mesenchymal stromal cells [J]. *Biomolecules*, 2021, 11(1): 87.
- [65] Cosco D, Failla P, Costa N, *et al.* Rutin-loaded chitosan microspheres: Characterization and evaluation of the anti-inflammatory activity [J]. *Carbohydr Polym*, 2016, 152: 583-591.
- [66] Song H L, Zhang X, Wang W Z, *et al.* Neuroprotective mechanisms of rutin for spinal cord injury through anti-oxidation and anti-inflammation and inhibition of p38 mitogen activated protein kinase pathway [J]. *Neural Regen Res*, 2018, 13(1): 128-134.
- [67] Chen J C, Wu J H, Mu J F, *et al.* An antioxidative sophora exosome-encapsulated hydrogel promotes

- spinal cord repair by regulating oxidative stress microenvironment [J]. *Nanomedicine*, 2023, 47: 102625.
- [68] Wang Q L, Zhuang X Y, Mu J Y, *et al.* Delivery of therapeutic agents by nanoparticles made of grapefruit-derived lipids [J]. *Nat Commun*, 2013, 4: 1867.
- [69] Niu W B, Xiao Q, Wang X J, *et al.* A biomimetic drug delivery system by integrating grapefruit extracellular vesicles and doxorubicin-loaded heparin-based nanoparticles for glioma therapy [J]. *Nano Lett*, 2021, 21(3): 1484-1492.
- [70] Zhang M Z, Xiao B, Wang H, *et al.* Edible ginger-derived nano-lipids loaded with doxorubicin as a novel drug-delivery approach for colon cancer therapy [J]. *Mol Ther*, 2016, 24(10): 1783-1796.
- [71] Zhang M Z, Viennois E, Prasad M, *et al.* Edible ginger-derived nanoparticles: A novel therapeutic approach for the prevention and treatment of inflammatory bowel disease and colitis-associated cancer [J]. *Biomaterials*, 2016, 101: 321-340.

[责任编辑 赵慧亮]