

## 人参囊泡调控肿瘤免疫微环境的活性成分研究

肖莲莲<sup>1,2</sup>, 余灵静<sup>1,2</sup>, 刘艺芃<sup>1,2</sup>, 胡杨<sup>1,2</sup>, 张云羽<sup>1,2</sup>, 嵇晶<sup>1,2</sup>, 程建明<sup>1,2\*</sup>

1. 南京中医药大学药学院, 江苏 南京 210023

2. 江苏省经典名方工程研究中心, 江苏 南京 210023

**摘要:** **目的** 探讨人参 *Panax ginseng* 来源的细胞外囊泡 (ginseng-derived nanoparticles, GDNPs) 在调控肿瘤相关巨噬细胞表型及抑制黑色素瘤生长方面的潜在物质基础。**方法** 采用纳米颗粒跟踪分析仪、透射电镜测试及紫外-可见分光光度法全面表征 GDNPs 及其主要成分 (蛋白质、多糖和皂苷) 的含量; 通过 qRT-PCR 和流式细胞术检测 GDNPs 与其含有的多糖、皂苷成分对骨髓来源巨噬细胞 (bone marrow-derived macrophage, BMDM) 表型的调控影响。收集不同极化程度的 BMDM 条件培养基 (conditional medium, CM) 孵育小鼠皮肤黑色素瘤 B16F10 细胞, CCK-8 法测定不同 CM 处理后 B16F10 细胞活力, 验证活性成分对肿瘤免疫微环境的调控作用; 通过 PMP 柱前衍生法定量分析 GDNPs 活性成分组成。**结果** 透射电镜下观察 GDNPs 形态结构良好, 含量测定结果为  $2.46 \times 10^{11}$  颗粒的 GDNPs 含有 4.31 mg 蛋白质、4.46 mg 多糖、1.22 mg 皂苷。qRT-PCR 和流式细胞术实验结果显示 GDNPs 多糖可以逆转 M2 型巨噬细胞表型, 向 M1 方向极化。GDNPs 多糖诱导巨噬细胞极化后的 CM 显著抑制了 B16F10 细胞活力。PMP 柱前衍生法分析 GDNPs 多糖成分由葡萄糖、半乳糖、阿拉伯糖组成, 其物质的量比为 4.72 : 1.07 : 2.15。**结论** 揭示了 GDNPs 中多糖成分在调控肿瘤免疫微环境的关键作用, 为进一步的机制研究和临床应用提供了实验依据。

**关键词:** 人参细胞外囊泡; 肿瘤免疫微环境; 巨噬细胞极化; 多糖; 葡萄糖; 半乳糖; 阿拉伯糖

**中图分类号:** R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253 - 2670(2024)09 - 3006 - 09

**DOI:** 10.7501/j.issn.0253-2670.2024.09.015

## Active components of ginseng vesicles regulating tumor immune microenvironment

XIAO Lianlian<sup>1,2</sup>, YU Lingjing<sup>1,2</sup>, LIU Yipeng<sup>1,2</sup>, HU Yang<sup>1,2</sup>, ZHANG Yunyu<sup>1,2</sup>, JI Jing<sup>1,2</sup>, CHENG Jianming<sup>1,2</sup>

1. School of Pharmacy, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210023, China

2. Jiangsu Classic Famous Formula Engineering Research Center, Nanjing 210023, China

**Abstract: Objective** To explore the potential material basis of ginseng-derived nanoparticles (GDNPs) in regulating tumor-associated macrophage phenotype and inhibiting melanoma growth. **Methods** GDNPs and their major components (proteins, polysaccharides and saponins) were comprehensively characterized using nanoparticle tracking analyzer, transmission electron microscopy test and UV-Vis spectrophotometry. The regulatory effects of GDNPs and their polysaccharide and saponin components on the phenotype of bone marrow-derived macrophages (BMDM) were examined by qRT-PCR and flow cytometry experiments. B16F10 cells were incubated in BMDM conditioned medium (CM) with different degrees of polarization, and the viability of B16F10 cells was determined by CCK-8 assay to verify the modulation of the tumor immune microenvironment by the active ingredients. The active ingredient composition of GDNPs was quantified by PMP pre-column derivatization. **Results** The morphology and structure of GDNPs were well observed under transmission electron microscopy.  $2.46 \times 10^{11}$  particles of GDNPs contained 4.31 mg of protein, 4.46 mg of polysaccharides, and 1.22 mg of saponins. qRT-PCR and flow cytometry experiments showed that the polysaccharide group of GDNPs reversed the phenotype of the M2-type macrophage cells, which were polarized toward M1. GDNPs polysaccharides induced macrophage polarization after CM significantly inhibited the viability of B16F10 cells. PMP pre-column derivatization analysis of the polysaccharide components of GDNPs consisted of glucose, galactose, arabinose, and the substance amount ratio was 4.72 : 1.07 : 2.15. **Conclusion** The experimental results reveal the key role of the polysaccharide components of GDNPs in the

收稿日期: 2023-10-18

基金项目: 国家自然科学基金青年基金项目 (81803391)

作者简介: 肖莲莲, 硕士研究生, 研究方向为中药制药技术与产品开发。E-mail: 20210939@njucm.edu.cn

\*通信作者: 程建明, 研究员, 博士生导师, 主要从事中药新剂型、新技术研究及其产品开发。E-mail: 320320@njucm.edu.cn

modulation of the tumor immune microenvironment, and provide the experimental basis for further mechanism study and clinical application.

**Key words:** ginseng extracellular vesicles; tumor immune microenvironment; macrophage polarization; polysaccharides; glucose; galactose; arabinose

目前,肿瘤免疫治疗在癌症的进展及其治疗策略中占据核心地位,肿瘤免疫治疗是指免疫细胞渗透到肿瘤部位启动抗癌免疫应答,控制或杀灭肿瘤细胞的疗法。但肿瘤细胞会通过劫持免疫检查点、重塑肿瘤的细胞外基质形成阻止免疫细胞浸润的屏障,以及通过影响免疫抑制细胞和免疫微环境中相关信号通路形成免疫抑制的肿瘤微环境,从而逃避机体免疫系统识别和攻击<sup>[1-2]</sup>。肿瘤免疫微环境由免疫细胞、肿瘤细胞、细胞因子以及其他多种分子间的精细相互作用所构成。癌细胞与肿瘤微环境之间持续、动态的相互作用是促进肿瘤发生、发展和转移的关键因素。在此环境中,巨噬细胞作为免疫反应的关键效应细胞,其表型转变及功能活性对肿瘤免疫微环境具有显著的调控作用。它们可以根据刺激和环境因素被激活为 M1 型(经典激活)或 M2 型(替代激活)。M1 型巨噬细胞具备显著的抗肿瘤能力,呈现出免疫激活态,并能够释放免疫刺激性细胞因子。M2 型巨噬细胞则具有促进肿瘤生长和扩散的潜力,释放免疫抑制性因子<sup>[3-5]</sup>。鉴于此,诱导巨噬细胞向 M1 型表型的转变已被视为肿瘤治疗的潜在策略,通过调节巨噬细胞极化状态来优化肿瘤免疫微环境,进而增强免疫治疗效果。

几乎所有的细胞类型,无论是在体内还是体外,都会产生细胞外囊泡(extracellular vesicles, EVs),它们的结构、成分和分子加工反映了它们起源细胞中发生的活动<sup>[6]</sup>。植物来源 EVs 具有天然生物活性脂质、蛋白质、RNA 和其他药理活性分子,具有独特的形态和组成特征<sup>[7-9]</sup>。人参来源的细胞外囊泡(ginseng-derived nanoparticles, GDNPs)已经被证明具有调节免疫<sup>[10]</sup>、抗肿瘤<sup>[11]</sup>、抗衰老<sup>[12]</sup>、促进伤口愈合<sup>[13]</sup>、抗心肌损伤<sup>[14]</sup>、抗炎<sup>[15]</sup>、抗骨质疏松<sup>[16]</sup>的药理作用。之前的研究分别从体内、体外实验证明了 GDNPs 能够逆转肿瘤免疫微环境促进肿瘤相关巨噬细胞由 M2 向 M1 表型的极化,产生总活性氧,导致小鼠黑色素瘤细胞凋亡增加并显著抑制了荷瘤小鼠的黑色素瘤生长<sup>[17]</sup>。除此之外,药物通过血脑屏障治疗脑肿瘤的能力被认为是最重要的药物特性之一,而 GDNPs 在调节肿瘤免疫微环境,募集 M1

巨噬细胞的同时,对于透过血脑屏障靶向神经胶质瘤具有良好的潜力<sup>[18]</sup>。早期研究已揭示 GDNPs 内含丰富的代谢产物,并能够介导细胞间的信号通讯。这种介导机制主要通过 Toll 样受体 4 (Toll-like receptor 4, TLR4) 和髓样分化因子 88 (myeloid differentiation primary response 88, MyD88) 信号通路来实现,进而调节 M2 型巨噬细胞的功能,使其表现出抗肿瘤活性<sup>[17]</sup>。尽管有此初步发现,但 GDNPs 在调控肿瘤免疫微环境中的确切作用的活性成分还不完全。基于此,本研究旨在采用巨噬细胞极化模型,深入探讨 GDNPs 中的活性成分,以揭示其在肿瘤免疫微环境调控中的详细机制。

## 1 材料

### 1.1 动物与细胞株

SPF 级雄性 C57BL/6 小鼠,6~8 周龄,体质量 18~22 g,由南京安诺康生物科技有限公司提供,实验动物合格证编号为 NO.202343651,实验动物使用许可证号 SYXK(苏)2018-0049,饲养温度为 24~25 °C,相对湿度为 50%~60%,自由进食饮水。动物实验方案经南京中医药大学机构动物护理与使用委员会批准(批准号 202306A011)。

B16F10 小鼠皮肤黑色素瘤细胞系购自上海中科院细胞库。

### 1.2 药品与试剂

GDNPs 由实验室制备,具体方法参考文献<sup>[17]</sup>; RPMI 1640 完全培养基(批号 WHAA23X032)、0.02% EDTA 溶液(Versene 液,批号 WH2622F311)均购自武汉普诺赛生物科技有限公司;巨噬细胞集落刺激因子(macrophage colony-stimulating factor, M-CSF, 批号 0332537CL21)、白细胞介素-4(interleukin-4, IL-4, 批号 0332538KE01)、IL-13(批号 0332650NG026)均购自苏州近岸蛋白质科技股份有限公司;BCA 蛋白浓度测定试剂盒(批号 GK10009)购自美国 GpBio 公司;脂多糖(lipopolysaccharide, LPS, 批号 L8880)、红细胞裂解液(批号 20220818)均购自北京索莱宝科技有限公司;甲醇(批号 20230228)、乙醇(批号 20220325)、三氯甲烷(批号 20220311)、正丁醇(批号

20221020)、石油醚(批号 20220429)、无水磷酸二氢钠(批号 20220217)均为分析纯,购自国药集团化学试剂有限公司;高氯酸(批号 2012003)购自天津鑫源化工有限公司;流式细胞染色缓冲液(批号 2207X220780)购自上海懋康生物科技有限公司;PE 抗鼠 CD206 抗体(批号 B369245)、FITC 抗鼠 CD86 抗体(批号 B367027)、抗鼠 CD16/32 抗体(批号 B343988)均购自 Biolegend 公司;人参皂苷 Re 对照品(批号 AZ21122181,质量分数为 98%)购自成都埃法生物科技有限公司;岩藻糖标准品(批号 C20PB02541B)购自普西唐生物科技有限公司;标准品半乳糖(批号 S07HB193921)、葡萄糖醛酸(批号 R09J11H115178)、阿拉伯糖(批号 K28J12B135956)、半乳糖醛酸(批号 J09HB187862)、鼠李糖(批号 O12A10K95105)、木糖(批号 D17N9S74410)购自上海源叶生物科技有限公司;葡萄糖标准品(批号 E1811036)购自上海阿拉丁生化科技股份有限公司。

### 1.3 仪器

Gallios 分析型流式细胞仪(美国 Beckman 公司);Nanosight NS300 型纳米颗粒跟踪分析仪(英国 Malvern 公司);2695 型高效液相色谱仪、2998 型 PDA 紫外检测器(美国 Waters 公司)。

## 2 方法

### 2.1 GDNP 表征及稳定性测试

**2.1.1 透射电镜观察** 取适量 GDNP,使用 PBS 稀释至适当浓度。取 10  $\mu\text{L}$  稀释液滴在铜网上,静置 4 min,随后用 2%磷钨酸染色 3 min。在室温下自然风干后,置于 200 kV 电压的透射电镜下进行成像。

**2.1.2 粒径与粒子浓度的测定** 取适量 GDNP,并用 PBS 稀释到所需浓度,随后在纳米颗粒跟踪分析仪的自动模式下进行测量。

**2.1.3 稳定性测试** 将 GDNP 置于 4  $^{\circ}\text{C}$  保存,每天于同一时间点利用纳米颗粒跟踪分析仪测定粒径,连续测定 7 d,观察 GDNP 粒径变化。

### 2.2 蛋白质、多糖、皂苷类成分含量测定

**2.2.1 蛋白质含量测定** 根据 BCA 蛋白浓度测定试剂盒测定蛋白质含量,精密量取供试品溶液 2  $\mu\text{L}$ ,用空白溶剂补足至 20  $\mu\text{L}$ ,各孔加入 200  $\mu\text{L}$  BCA 工作液,37  $^{\circ}\text{C}$  放置 30 min,在 562 nm 下测定各个样品吸光度( $A$ )值,按标准曲线计算其在 GDNP 中的含量。

**2.2.2 多糖含量测定** 采用苯酚硫酸法测定

GDNP 中的多糖含量,精密量取葡萄糖标准品溶液 0、0.1、0.2、0.4、0.6、0.8、1.0 mL 分别置于恒定质量的试管中,以蒸馏水补至 1.0 mL。精密加入 5%苯酚溶液 0.5 mL 及浓硫酸 2.5 mL,充分振荡 5 min,置沸水浴加入 20 min,立即置于冰水浴中冷却 3 min,在 488 nm 处测定各溶液的  $A$  值。精密量取供试品溶液 0.1 mL,测定方法同标准品,在 488 nm 处测定各供试品的  $A$  值,按标准曲线计算其在 GDNP 中的含量。

**2.2.3 皂苷类成分含量测定** 精密吸取人参皂苷 Re 对照品溶液 0、10、20、40、80、100、120  $\mu\text{L}$ ,分别置 10 mL 干燥的具塞试管中,60  $^{\circ}\text{C}$  水浴蒸干溶剂,精密加 5%香草醛冰醋酸溶液-高氯酸(2:8)的混合溶液 1 mL,置 60  $^{\circ}\text{C}$  水浴中加热 15 min,取出,置冰水浴中冷却,精密加冰醋酸 5 mL,摇匀,在 544 nm 处测定各溶液的  $A$  值。精密量取供试品溶液 300  $\mu\text{L}$ ,测定方法同标准品,在 544 nm 处测定各供试品的  $A$  值,按标准曲线计算其在 GDNP 中的含量。

### 2.3 GDNP 多糖、皂苷成分提取方法

取适量 GDNP 加入 10 倍量的去离子水在 80  $^{\circ}\text{C}$  下煎煮 2 h,趁热抽滤,收集滤液,减压浓缩至 10 mL,加入无水乙醇调整体积分数至 95%,4  $^{\circ}\text{C}$  静置过夜,收集沉淀,纯水复溶后使用 Sevag 法进行脱蛋白处理,蒸干溶剂,纯水复溶得到 GDNP 多糖样品(GP)。

取适量 GDNP 加入 10 倍量的 70%乙醇溶液回流提取 2 h,趁热抽滤,收集滤液,减压浓缩至无醇味,依次使用石油醚、三氯甲烷、水饱和正丁醇萃取,回收正丁醇层,蒸干,纯水复溶得到 GDNP 皂苷样品(GG)。

### 2.4 B16F10 细胞培养

B16F10 细胞用含 10%胎牛血清的 RPMI 1640 完全培养液,于 37  $^{\circ}\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  的细胞培养箱中培养,每隔 3 d 传代 1 次。

### 2.5 骨髓来源巨噬细胞(bone marrow-derived macrophage, BMDM)极化相关实验

**2.5.1 BMDM 提取** C57BL/6 小鼠脱颈处死,迅速浸泡在 75%乙醇中 5~10 min。在超净台上分离小鼠的股骨和胫骨,并转移至 PBS 中。利用无菌手术剪刀小心地切除股骨的两端,随后用 1 mL 带针注射器抽取 PBS,并注入股骨两端,使骨髓细胞流出到培养皿内。利用移液枪反复吹打,使细胞形成单

细胞悬液。细胞悬液过 100  $\mu\text{m}$  的细胞滤网,以去除细胞团块、骨碎片、皮毛和其他杂质。细胞悬液于室温 1 500 r/min 离心 5 min 后,去掉上清液。加入 1 mL 红细胞裂解液孵育 3 min,于室温 1 500 r/min 离心 5 min,然后用 PBS 洗涤细胞。将细胞重新悬浮在含 20 ng/mL M-CSF 的 RPMI 1640 完全培养基中。在显微镜下观察细胞形态,并放置在  $\text{CO}_2$  恒温培养箱中培养。每 2~3 天更换 1 次培养基,直到第 7 天观察到梭形细胞,标志着 BMDM 的成熟。

**2.5.2 qRT-PCR 分析 BMDM 的 CD206、CD86 mRNA 表达** 将成熟的 BMDM 调整至  $1 \times 10^6$  个/孔,设置空白组、模型组和给药组,空白组只添加不含胎牛血清的 RPMI 1640 培养基,模型组加入 20 ng/mL 的 IL-4、IL-13),孵育 48 h;给药组在添加 20 ng/mL 的 IL-4、IL-13 孵育 24 h 后,分别添加低、中、高剂量(10、20、40  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )的多糖提取物(GP1、GP2、GP3)或低、中、高剂量(3、6、12  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )的皂苷成分提取物(GG1、GG2、GG3)孵育至 48 h。给药结束后弃去培养基,用 PBS 缓冲液冲洗 2 次,按照试剂盒说明书提取细胞总 RNA 并合成 cDNA,进行 qRT-PCR 分析。引物序列见表 1。

表 1 引物序列  
Table 1 Primer sequences

基因	序列 (5'-3')
<i>GAPDH</i>	F: TGAAGCAGGCATCTGAGGG R: CGAAGGTGGAAGAGTGGGAG
<i>CD86</i>	F: TCAATGGGACTGCATATCTGCC R: GCCAAAATACTACCAGCTCACT
<i>CD206</i>	F: CAGGTGTGGGCTCAGGTAGT R: TGTGGTGAGCTGAAAGGTGA

**2.5.3 流式细胞术检测 BMDM 的 CD206、CD86 荧光表达** 将成熟的 BMDM 调整至  $1 \times 10^6$  个/孔,设置空白组、模型组和给药组,空白组只添加不含胎牛血清的 RPMI 1640 培养基,模型组加入 20 ng/mL 的 IL-4、IL-13),孵育 48 h;给药组在添加 20 ng/mL 的 IL-4、IL-13 孵育 24 h 后,分别添加 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  GDNPs 或低、中、高剂量(10、20、40  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )的多糖提取物(GP1、GP2、GP3)或低、中、高剂量(3、6、12  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )的皂苷成分提取物(GG1、GG2、GG3)孵育至 48 h。给药结束后,每孔加入 1 mL 0.02% EDTA 溶液,消化收集细胞,加入 1 mL 细胞染色缓冲液洗涤细胞 2 次,500  $\mu\text{L}$  细胞染色缓冲液重悬,收集细胞于 1.5 mL EP 管中。加入 Fc 受体封闭剂抗鼠 CD16/32 冰上孵育 10 min,然后加入 PE

抗鼠 CD206 抗体、FITC 抗鼠 CD86 抗体于冰上染色 30 min。孵育结束后,加入 1 mL PBS 洗涤细胞 2 次,4  $^{\circ}\text{C}$ 、1 500 r/min 离心 5 min;弃去上清,加入 500  $\mu\text{L}$  PBS 重悬细胞,过 300 目筛网转移至流式管中,使用流式细胞仪检测各个标记物的表达情况。

**2.5.4 BMDM 条件培养基 (conditional medium, CM) 的制备**<sup>[19-20]</sup> 诱导成熟的 BMDM 分为 M1 组(加入 100 ng/mL 的 LPS)、M2 组(加入 20 ng/mL 的 IL-4、IL-13)、GP1 组(在添加 IL-4、IL-13 孵育 24 h 后添加 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  GP 孵育至 48 h)、GP2 组(在添加 IL-4、IL-13 孵育 24 h 后添加 20  $\mu\text{g}/\text{mL}$  GP 孵育至 48 h)、GP3 组(在添加 IL-4、IL-13 孵育 24 h 后添加 40  $\mu\text{g}/\text{mL}$  GP 孵育至 48 h),给药孵育后得到不同极化的巨噬细胞,在无血清培养基中孵育 24 h 后弃去培养基,10 000 r/min 离心 5 min,收集上清作为 CM,分别得到 M1-CM、M2-CM、GP1-CM、GP2-CM、GP3-CM 用于孵育 B16F10 细胞,测定 B16F10 细胞活力以验证 GDNPs 中的活性成分。

## 2.6 CCK-8 法检测 B16F10 细胞活力

常规培养 B16F10 细胞,调整细胞数为  $5 \times 10^3$  个/mL,接种于 96 孔板,每孔加入细胞混悬液 100  $\mu\text{L}$ ,待细胞贴壁后,加入不同 CM 继续培养,空白组与调零孔(不含细胞)加入无血清培养基,24 h 后弃去旧培养基,每孔加入 100  $\mu\text{L}$  培养基洗涤 2 次后更换新的培养基,各孔加入 10  $\mu\text{L}$  的 CCK-8 试剂,37  $^{\circ}\text{C}$  孵育 4 h,并于酶标仪上读取各孔在 450 nm 处的 *A* 值,计算细胞活力。

$$\text{细胞活力} = (A_{\text{给药}} - A_{\text{调零}}) / (A_{\text{空白}} - A_{\text{调零}})$$

## 2.7 GDNPs 多糖的单糖组成分析及方法学考察<sup>[21-23]</sup>

**2.7.1 PMP 柱前衍生法分析单糖组成** 取适量 GDNPs,加入 3 mol/L 三氟乙酸溶液 3 mL,超声溶解,封口,110  $^{\circ}\text{C}$  水解 6 h,放冷至室温,3 000 r/min 离心 10 min,取上清液减压蒸干,加甲醇溶解蒸干 5~6 次,残渣加超纯水溶解定容至 1 mL,制得水解后样品供试液。取葡萄糖、阿拉伯糖、鼠李糖、木糖、半乳糖、甘露糖、岩藻糖、葡萄糖醛酸、半乳糖醛酸标准品溶液及样品各 400  $\mu\text{L}$ ,加 400  $\mu\text{L}$  的 0.5 mol/L PMP 甲醇溶液和 400  $\mu\text{L}$  的 0.3 mol/L 氢氧化钠溶液,混匀,70  $^{\circ}\text{C}$  水浴加热 100 min 后,再加 500  $\mu\text{L}$  的 0.3 mol/L 盐酸,混匀。加入 2 mL 三氯甲烷萃取,剧烈摇晃,3 500 r/min 离心 5 min,弃去氯仿层,过 0.22  $\mu\text{m}$  滤膜得 PMP 衍生化样品。使用 Waters 高效液相色谱仪进行分析,色谱条件为

Agilent ZORBAX SB-aq C<sub>18</sub> 色谱柱 (150 mm×4.6 mm, 4 μm); 检测波长 250 nm; 柱温 25 °C; 体积流量 1 mL/min; 流动相为磷酸二氢钠盐缓冲液 (0.1 mol/L, pH 6.85) -乙腈 (82:18), 等度洗脱。

**2.7.2 线性关系考察** 按“2.7.1”项下方法制备各对照品系列质量浓度的 PMP 衍生化标准品溶液, 在“2.7.1”项色谱条件下进样分析。以葡萄糖、半乳糖、阿拉伯糖 3 个成分的质量浓度为横坐标 ( $X$ ), 峰面积为纵坐标 ( $Y$ ), 分析得到其线性回归方程、线性系数 ( $r$ ) 和线性范围分别为葡萄糖  $Y=585\ 162 X+837\ 782$ ,  $r=0.999\ 3$ , 线性范围 1.05~20.96 mg/mL; 半乳糖  $Y=901\ 803 X+35\ 251$ ,  $r=0.999\ 6$ , 线性范围 0.20~12.26 mg/mL; 阿拉伯糖  $Y=950\ 752 X-92\ 833$ ,  $r=0.999\ 7$ , 线性范围 0.35~10.46 mg/mL。结果显示, 3 个成分的线性系数在 0.999 3~0.999 7, 符合线性关系考察要求。

**2.7.3 精密度试验** 取上述对照品溶液, 按照“2.7.1”项下制备 PMP 衍生化标准品溶液, 在“2.7.1”项色谱条件下连续进样 6 次, 测定峰面积并计算 RSD 值。结果显示, 葡萄糖、半乳糖、阿拉伯糖 3 个成分的峰面积 RSD 分别为 1.23%、1.19%、1.36%, 均小于 3%, 表明仪器精密度良好。

**2.7.4 稳定性试验** 取 GDNPs 样品, 按照“2.7.1”项下方法制备 PMP 衍生化供试品溶液, 室温下于 0、2、4、8、12 h 在“2.7.1”项色谱条件下进样测定峰面积并计算 RSD 值。结果显示, 供试品溶液中葡萄糖、半乳糖、阿拉伯糖 3 个成分的峰面积 RSD 分别为 2.34%、2.78%、2.06%, 均小于 3%, 表明供试品溶液在 12 h 内稳定性良好。

**2.7.5 重复性试验** 取 GDNPs 样品, 按照“2.7.1”项下方法平行制备 6 份 PMP 衍生化供试品溶液, 按“2.7.1”项色谱条件下进样测定峰面积并计算

RSD 值。结果显示, 供试品溶液中葡萄糖、半乳糖、阿拉伯糖的峰面积 RSD 分别为 1.40%、1.82%、1.52%, 均小于 3%, 表明该方法重复性较好。

**2.7.6 加样回收率试验** 精密量取 6 份已测定单糖含量的 GDNPs 样品, 每份 1 mL, 分别精密加入样品中指标成分质量与对照品质量比例约为 1:1 的对照品溶液, 按照“2.7.1”项下方法制备 PMP 衍生化供试品溶液, 在“2.7.1”项色谱条件下进样测定, 计算各供试品的加样回收率和 RSD 值。结果显示, 葡萄糖、半乳糖、阿拉伯糖 3 个成分的平均加样回收率分别为 98.30%、102.11%、101.76%, RSD 分别为 2.52%、2.08%、1.79%, 且均小于 3%, 加样回收率试验结果良好。

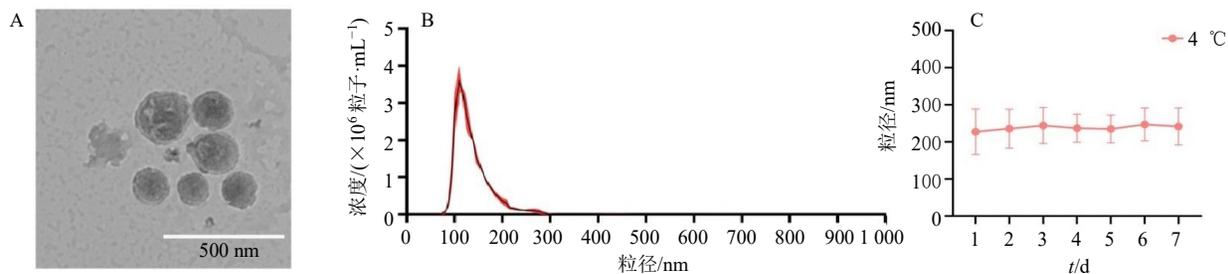
## 2.8 统计学分析

本研究中细胞实验均重复 3 次, 结果以  $\bar{x} \pm s$  表示。所有数据使用 GraphPad Prism 8 8.0 软件进行分析, 采用非配对 Student's  $t$  检验。

## 3 结果

### 3.1 GDNPs 的表征及稳定性测试

GDNPs 是由人参细胞分泌的一种具有膜结构的小泡, 能够携带蛋白质、mRNA、miRNA 和代谢物等成分, 在植物机体中参与生长代谢过程。对 GDNPs 进行表征如图 1-A 所示, 在透射电镜下可以看出 GDNPs 呈双层膜结构的圆形小泡, 独特空间结构可作为载体运载人参的活性成分靶向受体部位, 介导一系列的生物学功能。使用纳米颗粒跟踪分析仪测定 GDNPs 的粒径, 结果见图 1-B, GDNPs 的粒径分布在 60~320 nm。本研究利用纳米颗粒跟踪分析仪连续 7 d 监测 GDNPs 在 4 °C 环境存放过程中的粒径变化, 结果如图 1-C 所示, GDNPs 的粒径并无明显变化, 表明在 4 °C 条件下 GDNPs 可以储存 7 d, 且稳定性良好。



A-GDNPs 超微结构; B-GDNPs 粒径; C-GDNPs 在 4 °C 环境存放过程中的粒径变化。

A-ultrastructure of GDNPs; B-particle size of GDNPs; C-particle size changes of GDNPs during storage at 4 °C.

图 1 GDNPs 表征及稳定性测试结果

Fig. 1 Results of GDNPs characterization and stability experiments

### 3.2 GDNPs 的含量测定

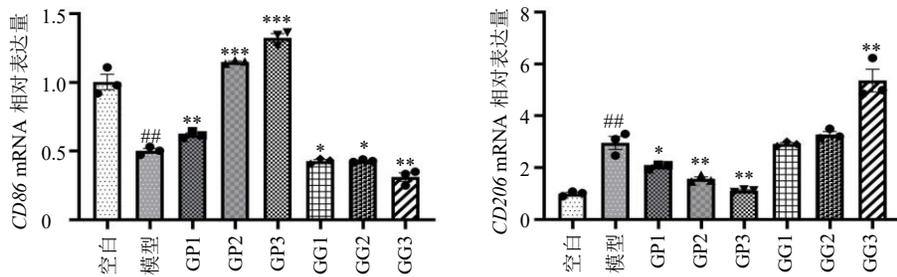
2.46×10<sup>11</sup> 颗粒的 GDNPs 含有 4.31 mg 蛋白质、4.46 mg 多糖、1.22 mg 皂苷，结果显示多糖成分的含量最高。在目前的研究报道中，人参中多糖成分与皂苷均具有逆转巨噬细胞表型，调控肿瘤免疫微环境的作用<sup>[3,24]</sup>。前期研究已经证明 GDNPs 脂质和蛋白质导致了 M2 型巨噬细胞极化的改变<sup>[17]</sup>。本研究进一步对 GDNPs 中的皂苷与多糖是否为调控巨噬细胞表型活性成分进行研究。

### 3.3 不同成分对 M2 型 BMDM 极化的影响

#### 3.3.1 不同成分对 M2 型 BMDM CD206、CD86 mRNA 表达的影响

细胞表型的活性成分，分别提取了 GDNPs 的多糖与皂苷成分。CD206 为 M2 型巨噬细胞表面标志物，CD86 为 M1 型巨噬细胞表面标志物。由图 2 可知，GP 组可以改变巨噬细胞表型，向 M1 方向极化，而 GG 组不能逆转 M2 型巨噬细胞的极化表型。

**3.3.2 不同成分对 M2 型 BMDM CD206、CD86 荧光表达的影响** 如图 3 所示，GP 组与 GG 组结果同 qRT-PCR 实验结果一致，GP 组诱导的巨噬细胞表面标志物 CD86 和 CD206 均呈显著性升高和降低 ( $P < 0.05, 0.01$ )。其中 GDNPs 组对于逆转 M2 型巨噬细胞表型药理效应最佳，这可能与 GDNPs 具有纳米囊泡结构有关，提高了生物利用度。GG 组



与空白组比较: <sup>##</sup> $P < 0.01$  <sup>###</sup> $P < 0.001$ ; 与模型组比较: <sup>\*</sup> $P < 0.05$  <sup>\*\*</sup> $P < 0.01$  <sup>\*\*\*</sup> $P < 0.001$ , 图 3 同。  
<sup>##</sup> $P < 0.01$  <sup>###</sup> $P < 0.001$  vs blank group; <sup>\*</sup> $P < 0.05$  <sup>\*\*</sup> $P < 0.01$  <sup>\*\*\*</sup> $P < 0.001$  vs model group, same as fig. 3.

图 2 不同成分对 M2 型 BMDM CD206、CD86 mRNA 表达的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Fig. 2 Effects of different components on CD206, CD86 mRNA expressions in M2 type BMDM ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

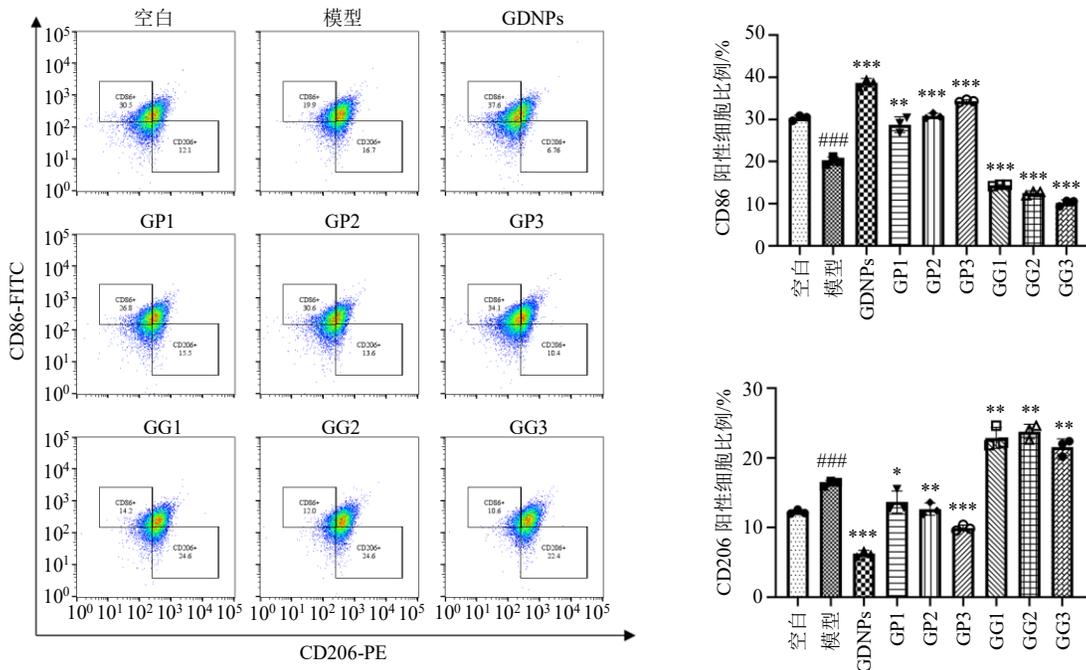


图 3 不同成分对 M2 型 BMDM CD206、CD86 荧光表达的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Fig. 3 Effects of different components on CD206, CD86 fluorescence expressions in M2 type BMDM ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

虽然没有对 M2 型巨噬细胞表型起逆转作用，但其驱使巨噬细胞继续向替代激活的 M2 抗炎表型极化，其抗炎作用可能协同其他活性成分，防止过度逆转 M2 表型，避免 GDNPs 对机体造成炎症损伤。

### 3.4 活性成分处理的巨噬细胞 CM 抑制 B16F10 细胞增殖

为了进一步验证 GP 是否为 GDNPs 介导调控肿瘤免疫微环境发挥抗癌效应的活性成分，制备不同成分诱导后的巨噬细胞 CM，使用不同 CM 处理 B16F10 细胞 24 h，通过 CCK-8 法评价不同 CM 对 B16F10 细胞增殖作用的影响。如图 4 所示，M2-CM 无明显抑制 B16F10 细胞增殖的作用，GP-CM 能够显著抑制 B16F10 细胞的增殖。

### 3.5 活性多糖成分的单糖组成分析

采用 PMP 柱前衍生法对活性 GP 进行单糖组成分析，图 5-A、B 分别为单糖标准品色谱图、GDNPs

活性多糖成分水解液的色谱图。经 HPLC 测定 GDNPs 活性多糖由葡萄糖、半乳糖、阿拉伯糖组成，其物质的量比为 4.72 : 1.07 : 2.15。

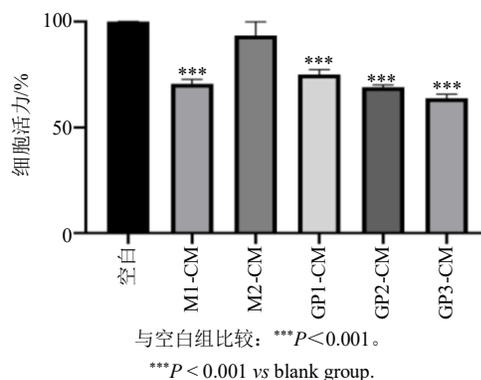
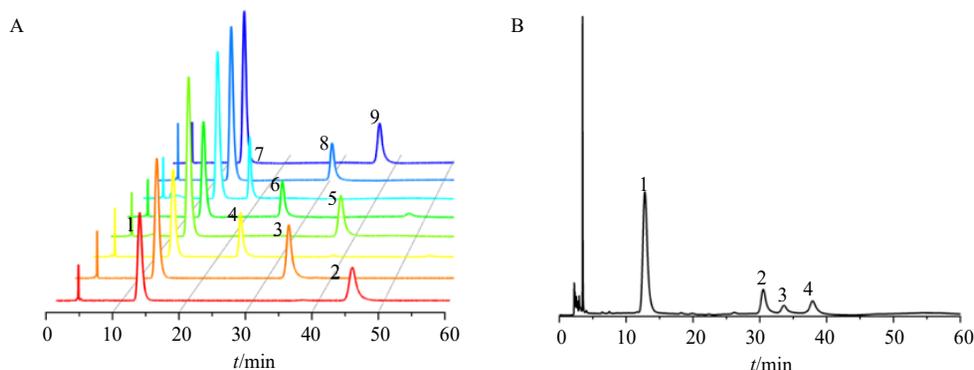


图 4 不同极化程度的 BMDM-CM 对 B16F10 细胞活力的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Fig. 4 Effect of BMDM-CM with different degrees of polarization on B16F10 cell viability ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )



A-单糖标准品色谱图 (1-PMP, 2-岩藻糖, 3-半乳糖, 4-葡萄糖醛酸, 5-阿拉伯糖, 6-半乳糖醛酸, 7-鼠李糖, 8-葡萄糖, 9-木糖); B-水解 GDNPs 多糖样品的色谱图 (1-PMP, 2-葡萄糖, 3-半乳糖, 4-阿拉伯糖)。  
A-chromatograms of monosaccharide standards (1-PMP, 2-fucose, 3-galactose, 4-glucuronide, 5-arabinose, 6-galacturonide, 7-rhamnose, 8-glucose, 9-xylose); B-chromatograms of polysaccharide samples from hydrolyzed GDNPs (1-PMP, 2-glucose, 3-galactose, 4-arabinose).

图 5 通过 HPLC 与 PMP 柱前衍生化对 GDNPs 多糖进行单糖成分分析

Fig. 5 Monosaccharide composition analysis of GDNPs polysaccharides by HPLC with PMP pre-column derivatization

## 4 讨论

目前，治疗癌症方法不再专注于靶向肿瘤细胞本身，因为癌症的进展是由肿瘤细胞和肿瘤部位环境之间的相互作用调控的，肿瘤微环境是一个以肿瘤为主体，由肿瘤细胞、基质细胞、免疫细胞和细胞外基质组成的复杂的肿瘤生态系统。在肿瘤微环境中，巨噬细胞与肿瘤细胞、免疫细胞和基质细胞的密集对话可以驱动促或抗肿瘤表型。反之，肿瘤相关的巨噬细胞在肿瘤微环境中强烈塑造细胞因子和代谢物水平，因此在抗肿瘤免疫中发挥重要作用。M1 型巨噬细胞通过支持 1 型 T 辅助性细胞 (1 type

helper T-lymphocyte, Th1) 介导的抗癌反应和促进细胞毒性 T 细胞的招募来促进肿瘤相关巨噬细胞的抗肿瘤反应<sup>[25-28]</sup>。

植物来源的 EVs 相较于动物细胞外囊泡展示出一系列显著的优越性<sup>[29-32]</sup>。这些优势主要体现在植物 EVs 的低免疫原性上，这一特性在治疗应用中显得尤为重要，因为它极大降低了引发免疫系统反应的可能性。此外，从经济和可持续发展的角度来看，植物细胞的批量培养过程既经济又高效，相比之下，动物细胞的培养更为复杂和成本较高。植物 EVs 在极端环境条件下展现出的稳定性，如高温和干燥条件下的稳

定性,对于药物的长期储存和运输是一个不可忽视的优点。从药物递送的角度来看,植物 EVs 作为天然的载体,能够有效地运输包括 RNA、DNA 和蛋白质在内的多种药物分子。这种生物相容性强的特性,减少了在临床应用中产生不良反应的风险。而且,选择植物源的 EVs 作为递送载体,可以避免与动物源相关的污染和病原体传播的风险。在某些情况下,特定植物的 EVs 还可能包含有独特的生物活性成分,这为开发新型治疗策略提供了潜在的途径<sup>[33]</sup>。

植物 EVs 在药物输送系统中的应用尤其引人注目。它们被认为是一种生物兼容、可生物降解且来源广泛的纳米输送系统,可用于无细胞治疗。在临床前和临床研究中,植物 EVs 已显示出比传统合成载体更多的优势,为新型药物输送系统开辟了新的前沿领域。例如,姜源 EVs 在改变肠道菌群和调节宿主生理以抑制结肠炎方面展现出了潜力<sup>[34]</sup>。Umezu 等<sup>[35]</sup>证明了针叶樱桃衍生的纳米囊泡在封装和保护核酸方面的可行性,以及它们在将这些化合物递送至体内靶位点的有效性。Pomatto 等<sup>[36]</sup>研究了来源于柑橘汁的 EVs 作为口服给药的编码严重急性呼吸系统综合征冠状病毒 2 型 S1 蛋白亚基的信使核糖核酸疫苗的载体,该疫苗具有胃抗性口服胶囊制剂。加载到 EVs 中的 mRNA 受到保护,并且在冷冻干燥和封装后在室温下稳定 1 年。

GDNPs 在调节肿瘤免疫微环境方面已显示出显著的潜力,Han 等<sup>[37]</sup>研究证明 GDNPs 可以重组肿瘤相关巨噬细胞,增加 CC 类趋化因子 5 (CC chemokine ligand 5, CCL5) 和趋化因子 CXC 配体 9 (C-X-C motif chemokine 9, CXCL9) 的分泌,招募 CD8<sup>+</sup> T 细胞进入肿瘤床,将冷肿瘤微环境转换为热肿瘤微环境改善免疫检查点抑制剂治疗效果。Lv 等<sup>[10]</sup>研究发现由于 GDNPs 改变了精氨酸酶-1 的表达,从而激活哺乳动物雷帕霉素靶蛋白 (mammalian target of rapamycin, mTOR) 活性,同时上调由 mTOR 活性调节的 T-bet 表达。而促进 T 细胞耗竭的 T 细胞中转录因子 Eomes 和 Tox 的表达受到抑制,最终降低了免疫检查点的表达,改善了 T 细胞耗竭,恢复了 T 细胞的抗肿瘤作用,更好地治疗癌症。为了进一步研究 GDNPs 的药理学作用机制,本研究对其物质基础进行了分析讨论, GDNPs 多糖相较于蛋白质、皂苷含量最多,可以有效逆转肿瘤相关巨噬细胞的表型,同时 GDNPs 多糖作用巨噬细胞后的培养基可有效抑制 B16F10 细

胞的增殖能力。M1 型巨噬细胞主导的免疫微环境有助于炎症反应,但也可能导致周围健康组织的损伤。此外发现, GDNPs 皂苷能够调节炎症环境,促进肿瘤环境中的巨噬细胞向抗炎表型极化,可以避免持续的炎症反应导致组织损伤与功能障碍。综上,本研究揭示了 GDNPs 中多糖成分的关键作用,为进一步的机制研究和临床应用提供了有价值的信息。未来的研究可以进一步探讨 GDNPs 的其他活性成分,以及如何优化其在肿瘤治疗中的应用。

**利益冲突** 所有作者均声明不存在利益冲突

#### 参考文献

- [1] 高壬驰,陈潼,孟兰迪杨,等. 肿瘤免疫微环境及其在靶向治疗中的应用 [J]. 中国新药与临床杂志, 2024, 43(2): 120-127.
- [2] 褚国良,凤志慧. 靶向肿瘤相关巨噬细胞用于肿瘤免疫治疗的研究进展 [J]. 中国药理学与毒理学杂志, 2023, 37(4): 281-288.
- [3] Fendl B, Berghoff A S, Preusser M, *et al.* Macrophage and monocyte subsets as new therapeutic targets in cancer immunotherapy [J]. *ESMO Open*, 2023, 8(1): 100776.
- [4] 王盛典,贾明明. 肿瘤免疫微环境在肿瘤常规治疗效应中的作用 [J]. 中国肿瘤生物治疗杂志, 2012, 19(3): 229-238.
- [5] 姜祺,郑新,沈欢,等. 肿瘤相关巨噬细胞及其靶向治疗的研究进展 [J]. 中国细胞生物学报, 2022, 44(10): 1944-1953.
- [6] Rahmati S, Karimi H, Alizadeh M, *et al.* Prospects of plant-derived exosome-like nanocarriers in oncology and tissue engineering [J]. *Hum Cell*, 2024, 37(1): 121-138.
- [7] 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.
- [8] 苏勇汇,徐珊珊,王欢,等. 药用植物细胞外囊泡作为新型药效物质的研究进展 [J]. 中草药, 2023, 54(12): 4044-4052.
- [9] 中国研究型医院学会细胞外囊泡研究与应用专业委员会中草药囊泡研究与应用专家委员会, 中草药囊泡广东省工程研究中心, 广东省中医药学会中草药囊泡研究与应用专业委员会, 等. 中草药囊泡研究与应用专家共识 (2023 年版) [J]. 中草药, 2024, 55(1): 12-22.
- [10] Lv Y, Li M Y, Weng L, *et al.* Ginseng-derived nanoparticles reprogram macrophages to regulate arginase-1 release for ameliorating T cell exhaustion in tumor microenvironment [J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2023, 42(1): 322.
- [11] 刘恬佳. 人参根外囊泡的提取工艺及其抗肿瘤活性研究 [D]. 长春: 长春中医药大学, 2022.

- [12] Cho E G, Choi S Y, Kim H, *et al.* Panax ginseng-derived extracellular vesicles facilitate anti-senescence effects in human skin cells: An eco-friendly and sustainable way to use ginseng substances [J]. *Cells*, 2021, 10(3): 486.
- [13] 卢姝言, 杨松, 任李梅, 等. 人参外泌体促进 HaCat 细胞增殖和伤口愈合 [J]. 中国生物化学与分子生物学报, 2021, 37(11): 1510-1519.
- [14] 刘恬佳, 邱智东, 邱野, 等. 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 [J]. 中草药, 2021, 52(12): 3514-3521.
- [15] 杨松. 人参外泌体的分离鉴定及其对炎症性肠病的干预作用和机制研究 [D]. 长春: 长春中医药大学, 2023.
- [16] Seo K, Yoo J H, Kim J, *et al.* Ginseng-derived exosome-like nanovesicles extracted by sucrose gradient ultracentrifugation to inhibit osteoclast differentiation [J]. *Nanoscale*, 2023, 15(12): 5798-5808.
- [17] 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.
- [18] Kim J, Zhu Y, Chen S H, *et al.* Anti-glioma effect of ginseng-derived exosomes-like nanoparticles by active blood-brain-barrier penetration and tumor microenvironment modulation [J]. *J Nanobiotechnology*, 2023, 21(1): 253.
- [19] Xu F, Cui W Q, Wei Y, *et al.* Astragaloside IV inhibits lung cancer progression and metastasis by modulating macrophage polarization through AMPK signaling [J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2018, 37(1): 207.
- [20] 张云超, 马金昀, 程晓东. 红花多糖诱导巨噬细胞 M1 型极化及抑制黑色素瘤细胞侵袭迁移的实验研究 [J]. 免疫学杂志, 2021, 37(5): 380-389.
- [21] 黄小兰, 何旭峰, 杨勤, 等. PMP 柱前衍生化 HPLC 法测定地参多糖的单糖组成 [J]. 食品与发酵工业, 2020, 46(7): 250-256.
- [22] 周彦强, 吴光斌, 陈发河. PMP 柱前衍生化 HPLC 法测定黄秋葵多糖的单糖组成 [J]. 食品科学, 2019, 40(4): 266-271.
- [23] 王小燕, 郭常润, 常军民, 等. 怀牛膝多糖的柱前衍生化-HPLC 指纹图谱建立及单糖成分含量测定 [J]. 中国药房, 2021, 32(3): 294-300.
- [24] Li M, Wang X, Wang Y, *et al.* Strategies for remodeling the tumor microenvironment using active ingredients of ginseng-A promising approach for cancer therapy [J]. *Front Pharmacol*, 2021, 12: 797634.
- [25] 王旭奔, 魏海明, 郑小虎. 肿瘤免疫微环境中的 NK 细胞及免疫治疗 [J]. 中国肿瘤生物治疗杂志, 2022, 29(12): 1057-1066.
- [26] 郭秋均, 李杰. 肿瘤相关巨噬细胞在重塑肿瘤免疫微环境中的作用 [J]. 肿瘤, 2013, 33(10): 922-927.
- [27] 王静雅, 夏思源, 赵慧媛, 等. 树突状细胞在肿瘤免疫中作用的初步研究 [J]. 南开大学学报: 自然科学版, 2019, 52(3): 7-10.
- [28] Munakata L, Tanimoto Y, Osa A, *et al.* Lipid nanoparticles of Type-a CpG D35 suppress tumor growth by changing tumor immune-microenvironment and activate CD8 T cells in mice [J]. *J Control Release*, 2019, 313: 106-119.
- [29] He B Y, Hamby R, Jin H L. Plant extracellular vesicles: Trojan horses of cross-Kingdom warfare [J]. *FASEB Bioadv*, 2021, 3(9): 657-664.
- [30] 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.
- [31] Yang M, Luo Q Q, Chen X, *et al.* Bitter melon derived extracellular vesicles enhance the therapeutic effects and reduce the drug resistance of 5-fluorouracil on oral squamous cell carcinoma [J]. *J Nanobiotechnology*, 2021, 19(1): 259.
- [32] de Robertis M, Sarra A, D'Oria V, *et al.* Blueberry-derived exosome-like nanoparticles counter the response to TNF- $\alpha$ -induced change on gene expression in EA.hy926 cells [J]. *Biomolecules*, 2020, 10(5): 742.
- [33] Logozzi M, Di Raimo R, Mizzoni D, *et al.* The potentiality of plant-derived nanovesicles in human health-a comparison with human exosomes and artificial nanoparticles [J]. *Int J Mol Sci*, 2022, 23(9): 4919.
- [34] 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.
- [35] Umezu T, Takanashi M, Murakami Y, *et al.* Acerola exosome-like nanovesicles to systemically deliver nucleic acid medicine via oral administration [J]. *Mol Ther Methods Clin Dev*, 2021, 21: 199-208.
- [36] Pomatto M A C, Gai C, Negro F, *et al.* Oral delivery of mRNA vaccine by plant-derived extracellular vesicle carriers [J]. *Cells*, 2023, 12(14): 1826.
- [37] Han X, Wei Q, Lv Y, *et al.* Ginseng-derived nanoparticles potentiate immune checkpoint antibody efficacy by reprogramming the cold tumor microenvironment [J]. *Mol Ther*, 2022, 30(1): 327-340.