

石见穿外泌体通过诱导肝癌细胞铁死亡及凋亡抑制肿瘤生长

王智槟¹, 杨仁义¹, 张婧婷¹, 陈红瑶¹, 吴玲¹, 卢芳国^{1*}, 曾普华^{2*}

1. 湖南中医药大学, 湖南 长沙 410208

2. 湖南省中西医结合医院 (湖南省中医药研究院附属医院), 湖南 长沙 410125

摘要: **目的** 探究石见穿来源外泌体 (*Salvia chinensis*-derived nanoparticles, SDNPs) 诱导 SK-Hep-1 肝癌细胞及其皮下移植瘤铁死亡和凋亡的作用机制。 **方法** 分别采用超高速离心法和聚乙二醇 (polyethylene glycol, PEG) 沉淀法提取 SDNPs, 利用纳米颗粒跟踪分析技术和透射电子显微镜对 SDNPs 进行表征检测, BCA 法测定 SDNPs 蛋白浓度; 以 SK-Hep-1 肝癌细胞系为研究对象, 将细胞分为对照组和 SDNPs 低、高剂量 (15、30 $\mu\text{g/mL}$) 组以及索拉非尼 (100 nmol/L) 组, 采用 CCK-8 法、EdU 法和集落实验检测肝癌细胞增殖情况, 通过划痕实验、Transwell 小室实验检测细胞迁移、侵袭能力, 流式细胞术检测细胞凋亡情况, 透射电镜检测肝癌细胞超微结构变化, 荧光法检测胞内活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 水平, 比色法检测细胞中亚铁离子 (Fe^{2+})、谷胱甘肽 (glutathione, GSH) 和丙二醛 (malondialdehyde, MDA) 水平, Western blotting 法检测胱氨酸转运蛋白系统 (system xc⁻, xCT)、谷胱甘肽过氧化物酶 4 (glutathione peroxidase 4, GPX4) 和酰基辅酶 A 合成酶长链家族成员 4 (acyl-CoA synthetase 4, ACSL4) 蛋白表达; 通过 SK-Hep-1 肝癌细胞系皮下移植构建裸鼠成瘤模型, 将裸鼠随机分为对照组、石见穿 (0.147 g/g) 组和 SDNPs ig 给药组 (SDNPs-ig, 50 $\mu\text{g/g}$)、ip 给药组 (SDNPs-ip, 50 $\mu\text{g/g}$)、尾 iv 给药组 (SDNPs-tiv, 50 $\mu\text{g/g}$) 以及索拉非尼 (30 $\mu\text{g/g}$) 组, 每组 5 只, 观察 SDNPs 对 SK-Hep-1 肝癌细胞系皮下移植瘤的影响, 苏木素-伊红 (hematoxylin-eosin, HE) 染色观察肿瘤以及心、肝、肺和肾组织病理变化, 免疫组织化学染色 (immunohistochemistry, IHC) 检测 SK-Hep-1 肝癌细胞系皮下移植瘤细胞增殖情况。 **结果** 超高速离心法和 PEG 沉淀法均能提取 SDNPs, 但得到的 SDNPs 粒径峰度不统一, 超高速离心法粒径集中在 (144.8 $\pm$ 79.7) nm, PEG 沉淀法粒径集中在 88、157 和 202 nm; SDNPs 能够被肝癌细胞摄取, 与对照组比较, SDNPs 能显著抑制肝癌细胞的增殖 ($P<0.01$)、迁移 ($P<0.01$) 和侵袭 ($P<0.001$), 诱导肝癌细胞线粒体结构变化, 导致胞内 ROS 及 Fe^{2+} 、MDA 水平显著上升 ($P<0.05$ 、0.001), GSH 水平下降 ($P<0.01$ 、0.001), 并下调铁死亡相关蛋白 xCT、GPX4 ($P<0.05$ 、0.01、0.001) 表达, 上调 ACSL4 蛋白的表达 ($P<0.001$), 诱导肝癌细胞铁死亡; 与对照组比较, 石见穿组、索拉非尼组以及 SDNPs-ip、SDNPs-tiv 组的移植瘤体积明显减小 ($P<0.05$ 、0.01), 而 SDNPs-ig 组的移植瘤体积则无明显差异; IHC 结果表明, 与对照组比较, SDNPs-ig 组 Ki-67 和 xCT 蛋白表达无明显变化, 其他组以上蛋白表达均显著下降 ($P<0.01$ 、0.001); 各组小鼠心、肝、肺和肾组织无明显病理改变。 **结论** SDNPs 能被肝癌细胞摄取, 并抑制肝癌细胞的增殖、迁移和侵袭, 限制肝癌细胞皮下移植瘤的生长, 其机制可能与改变肝癌细胞线粒体功能、导致胞内过氧化物积累、诱发细胞铁死亡和凋亡有关。

关键词: 石见穿; 外泌体; 肝细胞癌; 铁死亡; 凋亡

中图分类号: R285.5

文献标志码: A

文章编号: 0253-2670(2024)19-6622-14

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2024.19.016

Salvia chinensis-derived nanoparticles inhibit tumor growth by inducing ferroptosis and apoptosis of hepatocellular carcinoma cells

WANG Zhibin¹, YANG Renyi¹, ZHANG Jingting¹, CHEN Hongyao¹, WU Ling¹, LU Fangguo¹, ZENG Puhua²

1. Hunan University of Chinese Medicine, Changsha 410208, China

2. Hunan Provincial Hospital of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine (The Affiliated Hospital of Hunan Academy of Traditional Chinese Medicine), Changsha 410125, China

收稿日期: 2024-05-28

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (82074425); 湖南省自然科学基金资助项目 (2023JJ30364, 2023JJ30448, 2023JJ30361); 长沙市自然科学基金资助项目 (kq2022264)

作者简介: 王智槟, 男, 硕士研究生, 从事中医药防治恶性肿瘤研究。E-mail: 453637202@qq.com

*通信作者: 卢芳国, 博士, 教授, 从事感染性疾病的中医药防治研究。E-mail: lufanguo0731@163.com

曾普华, 博士, 主任医师, 从事中西医结合防治恶性肿瘤研究。E-mail: zph120@126.com

Abstract: Objective To investigate the mechanism of SK-Hep-1 hepatoma cells and their subcutaneous transplanted tumor ferroptosis and apoptosis induced by *Salvia chinensis* - derived nanoparticles (SDNPs). **Methods** SDNPs were extracted by ultra-high speed centrifugation and polyethylene glycol (PEG) precipitation, respectively. SDNPs were characterized and detected by nanoparticle tracking analysis technology and transmission electron microscopy, and SDNPs protein concentration was determined by BCA method. SK-Hep-1 hepatocellular carcinoma cells were divided into control group, SDNPs low-, high-dose (15, 30 $\mu\text{g/mL}$) groups and sorafenib (100 nmol/L) group. The proliferation of hepatocellular carcinoma cells was detected by CCK-8 assay, EdU method and colony experiment. Cell migration and invasion capacity were detected by scratch assay and Transwell assay. Cell apoptosis was detected by flow cytometry. Ultrastructural changes in hepatocellular carcinoma cells were detected by transmission electron microscopy. Intracellular reactive oxygen species were detected by fluorescence. Ferrous ion (Fe^{2+}), glutathione (GSH) and malondialdehyde (MDA) levels were detected by colorimetric assays, and the cystine transporter system (system x_c^- , xCT), glutathione peroxidase 4 (GPX4) and acyl-CoA synthetase family member 4 (ACSL4) were detected by Western blotting. Nude mice were randomly divided into control group, *S. chinensis* group (0.147 g/g), SDNPs intragastric administration group (SDNPs-ig, 50 $\mu\text{g/g}$), intraperitoneal administration group (SDNPs-ip, 50 $\mu\text{g/g}$), tail intravenous administration group (SDNPs-tiv, 50 $\mu\text{g/g}$) and sorafenib (30 $\mu\text{g/g}$) group, five mice in each group, to observe the effect of SDNPs on subcutaneous transplantation of SK-Hep-1 hepatocellular carcinoma cell line, hematoxylin and eosin staining (HE) staining to detect tumors and pathological changes in heart, liver, lung and kidney tissues, and immunohistochemistry (IHC) to detect the proliferation of subcutaneous transplantation of SK-Hep-1 hepatocellular carcinoma cell line. **Results** Both ultracentrifugation and PEG precipitation methods can extract SDNPs, but the particle size kurtosis of SDNPs obtained is not uniform. The kurtosis of ultracentrifugation method is concentrated at (144.8 $\pm$ 79.7) nm, and the kurtosis of PEG precipitation method is concentrated at 88, 157 and 202 nm. SDNPs can be absorbed by hepatoma cells. Compared with the control group, SDNPs can significantly inhibit the proliferation ($P < 0.01$, 0.001), migration ($P < 0.01$) and invasion ($P < 0.001$) of hepatoma cells, induce mitochondrial structural changes in hepatoma cells, resulting in significant increase in intracellular ROS, Fe^{2+} and MDA levels ($P < 0.05$, 0.001), decrease in GSH levels ($P < 0.01$, 0.001), down-regulate ferroptosis-related proteins xCT and GPX4 ($P < 0.05$, 0.01, 0.001), up-regulate the expression of ACSL4 ($P < 0.001$), and induce ferroptosis in hepatoma cells. Compared with the control group, the transplanted tumors volume in the *S. chinensis*, sorafenib, SDNPs-ip and tiv group were significantly reduced ($P < 0.05$, 0.01), while the transplanted tumor volume in the SDNPs-ig group was not significantly different; IHC results showed that compared with the control group, the expression of Ki-67 and xCT proteins in the SDNPs-ig group did not change significantly, and the expression of proteins in the other groups and above decreased significantly ($P < 0.05$, 0.01). There were no obvious pathological changes in the heart, liver, lung and kidney tissues of mice in each group. **Conclusion** SDNPs can be internalized by hepatoma cells, inhibit the proliferation, migration and invasion of hepatoma cells, and limit the growth of subcutaneous transplanted tumors of hepatoma cells. The mechanism may be related to changes in mitochondrial function of hepatoma cells, accumulation of intracellular peroxides, and induction of cell iron death and apoptosis.

Key words: *Salvia chinensis* Benth.; exosomes; hepatocellular carcinoma; ferroptosis; apoptosis

原发性肝癌（以下简称“肝癌”）是世界范围内最常见且恶性程度最高的肿瘤之一，据统计，2022 年我国新增肝癌病例 36.8 万例，死亡病例 31.7 万例^[1]，对人类健康产生了极大威胁。目前临床肝癌患者以中晚期为主，进行根治性手术的机会较小，尽管靶向、免疫治疗以及其他治疗方式已取得了一定的疗效^[2]，但其伴随的不良反应，难以有效控制肿瘤扩散，以及患者长期生存率和复发率等问题仍然存在困扰^[3-4]。

外泌体是一种由细胞内细胞膜形成的小囊泡，其大小通常为 30~150 nm，具有磷脂双分子层结构和类似茶托状的形态。外泌体内部富含多种生物活性成分^[5]，包括核酸、蛋白质和脂质等。外泌体在细

胞间分子传递过程中发挥着重要作用，能够将细胞内的 DNA、RNA、蛋白质等物质转移到受体细胞，从而影响受体细胞的细胞行为和生理病理等^[6]。植物外泌体是从新鲜植物中提取的纳米颗粒，含有植物细胞中的多种脂质、蛋白质、mRNA 以及活性成分。植物外泌体提取过程简单，易于大规模生产，纯度高，能够充分保留植物本身的药用活性。植物外泌体中的脂质结构不仅能够有效促进肠道吸收，还能够装载植物中不溶于水的小分子物质。此外，植物外泌体在超低温保存条件下基本不会破坏其结构，且使用量较少，方便患者携带^[7-8]。

铁死亡是一种非凋亡的细胞程序性死亡方式，其在细胞死亡过程中未展现出细胞核形态的变化、

DNA 断裂以及半胱天冬酶激活等现象^[9]。铁死亡的主要特征在于细胞的死亡需要铁离子的参与,且细胞内会出现活性氧(reactive oxygen species, ROS)和脂质过氧化物的积累。铁离子引发的氧化应激会破坏细胞的氧化还原能力,从而导致细胞死亡,其形态学表现为细胞膜完整性丧失,线粒体皱缩、密度增大以及外膜破裂^[10]。

石见穿为唇形科植物华鼠尾草 *Salvia chinensis* Benth. 的全草,又名月下红、石打穿,具有清热解毒、活血化瘀、镇痛祛湿、散结消肿等功效和抗肿瘤作用^[11]。石见穿为常用抗癌中药,在临床肝癌治疗中已取得了较好的疗效^[12],此外,石见穿多糖也被证实具有抑制肿瘤生长的作用^[13]。本研究通过一种高效提取的方法获得石见穿来源的外泌体(*Salvia chinensis*-derived nanoparticles, SDNPs),并研究其对 SK-Hep-1 细胞凋亡和铁死亡的作用,同时评估 SDNPs 的生物安全性,旨在为 SDNPs 作为抗肿瘤潜在药物的药理学研究和临床应用提供参考。

1 材料

1.1 细胞株与动物

人肝癌细胞株 SK-Hep-1 (批号 CL-0212) 由武汉普诺赛生命科技有限公司提供。

SPF 级雄性 BALB/c 裸鼠,6~8 周龄,体质量 18~22 g,由湖南斯莱克景达生物科技有限公司提供,动物许可证号 SCXK (湘) 2021-0002。动物饲养于温度 24~25 ℃、相对湿度 50%~60%、明暗循环 12 h 的环境中,饲养期间正常饮水进食。动物实验方案经湖南中医药大学实验动物伦理委员会审核批准(批准号 LL2022101909)。

1.2 药品与试剂

石见穿购自广水市云台观运营管理有限公司,经湖南省中医药研究院附属医院中药师马荣丽鉴定为唇形科植物华鼠尾草 *S. chinensis* Benth. 的全草。

高糖 DMEM 基础培养基(批号 PM150210)、胎牛血清(批号 164210)、青霉素-链霉素混合液(批号 PB180120)、0.25% 胰蛋白消化酶(批号 PB180226)和 PBS 缓冲液(批号 PB180327)均购自武汉普诺赛生物科技有限公司;聚乙二醇(polyethylene glycol, PEG) 6000 (批号 P8250) 购自北京索莱宝科技有限公司;蔗糖(批号 15700101) 购自西陇科学股份有限公司;凋亡抑制剂(Z-VAD-

FMK, ZVF, 批号 HY-16658B)、铁死亡抑制剂(Ferostatin-1, Fer-1, 批号 HY-100579)和自噬抑制剂(双硫仑,批号 HY-B0240)均购自美国 Med Chemexpress 公司;BCA 试剂盒(批号 E-BC-K318-M) 购自武汉伊莱瑞特生物科技股份有限公司;细胞丙二醛(malondialdehyde, MDA)测定试剂盒(批号 A003-4-1)、微量还原型谷胱甘肽(glutathione, GSH)测定试剂盒(批号 A006-2-1) 购自南京建成生物工程研究所;亚铁离子(Fe^{2+})含量测定试剂盒(批号 BL1147B) 购自合肥白鲨生物科技有限公司;胱氨酸转运蛋白系统(system xc⁻, xCT)、谷胱甘肽过氧化物酶 4 (glutathione peroxidase 4, GPX4) 和 β -actin 抗体(批号 ab175186、ab125066、ab8226) 购自美国 Abcam 公司;HRP 标记的山羊抗兔二抗、HRP 标记的山羊抗小鼠二抗(批号 SA00001-2、SA00001-1) 购自武汉三鹰生物技术有限公司;酰基辅酶 A 合成酶长链家族成员 4 (acyl-CoA synthetase 4, ACSL4) 抗体(批号 DF12141) 购自江苏亲科生物研究中心有限公司。

1.3 仪器

ZetaView PMX 110 型纳米颗粒跟踪分析仪(德国 Particle Metrix 公司);Enspire 型多功能酶标仪(美国 Perkin Elmer 公司);Mini-PROTEAN Tetra 型小型垂直电泳槽、Cheemi Doc XRS + Imager 型化学发光系统(美国 Bio-Rad 公司);HT7700 型透射电子显微镜(日本 Hitachi 公司)。

2 方法

2.1 超速离心法和 PEG 沉淀法提取 SDNPs 及表征检测

2.1.1 SDNPs 的制备 石见穿剪碎,加入适量 4 ℃ 预冷的 PBS,破碎取汁,4 ℃、1000×g 离心 30 min,取上清;10000×g 离心 60 min,取上清,采用 0.45 μm 无菌滤嘴滤过,取上清液。采用超速离心法,将上清液于 4 ℃、100000×g 离心 90 min,收集沉淀。采用 PEG 沉淀法,将上清与 4 ℃ 预冷的 20% PEG 6000 溶液充分混合,4 ℃ 沉淀 24 h,10000×g 离心 30 min 收集沉淀。采用蔗糖梯度离心法分别对超高速离心法和 PEG 沉淀法所获得的 SDNPs 进行纯化^[14]。

2.1.2 透射电镜(transmission electron microscope, TEM)观察外泌体形态 将 SDNPs 以 1:10 的比例与电镜固定液混合,取 10 μL 样本滴加于铜网,静置 10 min,滴加 3% 磷酸铇溶液,染色 5 min,待液体晾干后,透射电镜下观察并采集图像。

2.1.3 粒径及粒子浓度 (nanoparticle tracking analysis, NTA) 检测 取 PBS 稀释后的 SDNPs 悬液, 于室温下进行 SDNPs 粒径分析。

2.1.4 蛋白浓度检测 按说明书提前配制标准品, 并配制 BCA 工作液, 96 孔板中每孔加入 BCA 工作液 200 μL , 随后加入 20 μL 的蛋白标准品或外泌体样本, 避光、37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 30 min, 利用酶标仪检测蛋白浓度。

2.2 细胞培养

SK-Hep-1 细胞复苏后接种于含 10% 胎牛血清的高糖 DMEM 培养基中, 置于 5% CO_2 、37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温培养箱中培养, 取对数生长期的细胞进行实验。

2.3 SDNPs 摄取检测

SK-Hep-1 细胞以 5×10^4 个/孔接种于 6 孔板, 10 $\mu\text{mol/L}$ Dil 工作液与 SDNPs 充分混匀, 避光孵育 30 min, 10 000 $\times g$ 离心 30 min, 取上清, 去除多余染料, 100 000 $\times g$ 离心 30 min, 取沉淀, 使用 PBS 重悬后, 获得外泌体组检测液; 以 PBS 替代 SDNPs 进行以上操作制备对照组检测液。将 2 种检测液分别加入到已贴壁生长的 SK-Hep-1 细胞 6 孔板中, 孵育 24 h, PBS 清洗后, 于荧光显微镜下进行观察。

2.4 SDNPs 干预浓度筛选

SK-Hep-1 细胞以 4×10^3 个/孔接种于 96 孔板中, 不含细胞仅含 100 μL 细胞培养液的孔设为空白组, 仅含 100 μL 细胞培养液的孔设为对照组, SDNPs 组加入含 100 μL 不同质量浓度含 SDNPs (1.875、3.750、7.500、15.000、30.000 和 60.000 $\mu\text{g/mL}$) 的细胞培养液, 每组 6 个复孔。

各组分别孵育 24、48、72 h, 孵育结束后, 每孔加入 10 μL CCK-8 工作液, 在 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养箱中继续孵育 1 h。采用酶标仪检测 450 nm 处吸光度 (A) 值, 计算各组细胞存活率。

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

2.5 细胞增殖检测

2.5.1 EdU 法 SK-Hep-1 细胞以 5×10^4 个/孔接种于 6 孔板中, 待细胞贴壁后, 分为对照组和 SDNPs 低、高剂量 (15、30 $\mu\text{g/mL}$) 组以及索拉非尼 (100 nmol/L) 组。染色前 2 h 加入 EdU 标记细胞, 多聚甲醛固定, 使用 Triton 100 破除细胞膜, 牛血清蛋白封闭 30 min, 按照说明书配制 click reaction buffer, 加入细胞培养皿中, 室温避光孵育 30 min 后, Hoechst 染核, 采用荧光显微镜进行拍照。

2.5.2 细胞集落实验 SK-Hep-1 细胞以 500 个/孔

接种于 6 孔板中, 每孔加入 2 mL 细胞悬液, 培养 48 h。细胞分组同“2.5.1”项下, 各组药物干预结束后, 弃细胞培养液, 更换细胞培养液继续培养 10~12 d, 甲醛固定, 染色。

2.5.3 CCK-8 法 SK-Hep-1 细胞以 4×10^3 个/孔接种于 96 孔板中, 细胞分组同“2.5.1”项下, 各组药物干预结束后, 弃除细胞培养液, 加入 100 μL 含药细胞培养液, 分组干预结束后加入 10 μL 的 CCK-8 工作液, 在 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养箱中继续孵育 1 h, 采用酶标仪检测 450 nm 处 A 值, 计算各组细胞存活率。

2.6 细胞迁移和侵袭检测

2.6.1 划痕实验 细胞分组同“2.5.1”项下, 在 6 孔板底面使用马克笔画 3 条平行的横线, 将 SK-Hep-1 细胞以 5×10^5 个/孔接种于 6 孔板中, 待细胞密度接近 90%, 使用 200 μL 枪头垂直于孔板, 画与标记线垂直的 3 条平行线, 使划痕与标记下交叉, 交叉点作为固定的监测点, 随后进行药物干预, 于显微镜下观察并拍照, 利用 Image J 软件处理数据, 计算相对划痕面积。

$$\text{相对划痕面积} = \text{最终划痕面积} / \text{初始划痕面积}$$

2.6.2 Transwell 小室实验 细胞分组同“2.5.1”项下, 将基质胶与无血清培养基以 1:8 的比例混合, 涂布在 Transwell 上室; 无血清培养基重悬 SK-Hep-1 细胞, 并以 1×10^4 个/孔的密度接种于上室, 下室加入 600 μL 含 10% 胎牛血清的细胞培养液。随后使用不同药物处理上室中的细胞, 并在 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 环境中孵育 24 h, 去除未侵袭的细胞后, 固定侵袭细胞, 染色, 在显微镜下观察、计数, 并拍照。

2.7 流式细胞术检测 SK-Hep-1 细胞凋亡

细胞分组同“2.5.1”项下, 药物干预 24 h 后, 使用不含 EDTA 的胰酶消化细胞, PBS 清洗后收集细胞, 使用 1:100 稀释的 Annexin V-FITC/PI 染色液重悬细胞, 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 20 min, 采用流式细胞仪检测肝癌细胞凋亡情况。

2.8 SDNPs 诱导 SK-Hep-1 细胞死亡表型筛选

SK-Hep-1 细胞以 4×10^3 个/孔接种于 96 孔板中, 待细胞贴壁, 对照组加入细胞培养液, SDNPs 组加入含 30 $\mu\text{g/mL}$ SDNPs 的细胞培养液, SDNPs+ZVF 组、SDNPs+Fer-1 组和 SDNPs+双硫仑组加入含 30 $\mu\text{g/mL}$ SDNPs 的细胞培养液, 同时分别加入 ZVF (40 $\mu\text{mol/L}$)、Fer-1 (1 $\mu\text{mol/L}$)、双硫仑 (1 mmol/L), 继续孵育 24 h 后, 弃除细胞培养液, 加入含 10% CCK-8 的细胞培养液, 在 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养箱中

继续孵育 1 h, 采用酶标仪检测 450 nm 处 A 值, 计算各组细胞存活率。

2.9 铁死亡相关检测

2.9.1 细胞内 ROS 水平检测 细胞分组同“2.5.1”项下。按 1:1 000 的比例使用无血清细胞培养基稀释 DCFH-DA, 获得 DCFH-DA 工作液, PBS 洗涤 3 次后, 加入工作液, 37 °C 孵育 30 min, PBS 洗涤 3 次后, 加入无血清细胞培养基, 于荧光显微镜下采集图像。

2.9.2 细胞内 GSH、MDA 及 Fe^{2+} 水平检测 细胞分组同“2.5.1”项下, 收集细胞, 根据试剂盒说明书进行操作, 选择相应波长检测 A 值。

2.9.3 Western blotting 检测 xCT、GPX4 和 ACSL4 蛋白表达 RIPA 裂解液裂解细胞 30 min, 4 °C、12 000 r/min 离心 10 min, 取上清, 采用 BCA 法进行蛋白浓度检测, 与 Loading buffer 按比例混匀后, 100 °C 金属浴使蛋白变性, 取 25 μ g 蛋白样品经十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳, 转至 PVDF 膜, 5%脱脂牛奶封闭 1 h, 加入一抗(xCT、GPX4 以 1:5 000 比例稀释, ACSL4 以 1:1 000 比例稀释), 4 °C 孵育过夜, TBST 洗涤 3 次, 加入二抗 37 °C 孵育 1 h, TBST 洗涤 3 次, ECL 化学发光底物进行显影, Image J 软件进行灰度值分析。

2.10 动物分组、造模及给药

BALB/c 裸鼠随机分为对照组、石见穿(0.147 g/g)组、索拉非尼(30 μ g/g)组以及 SDNPs ig 给药组(SDNPs-ig, 50 μ g/g)、ip 给药组(SDNPs-ip, 50 μ g/g)、尾 iv 给药组(SDNPs-tiv, 50 μ g/g), 每组 5 只。SDNPs 相当于石见穿临床等效剂量(以生药量计)的 100 倍所获得的外泌体, 石见穿组选择相同剂量制备浓缩液^[15]。将 SK-Hep-1 细胞用无血清细胞培养液配制成 5×10^7 个/mL 的细胞悬液, 于裸鼠右侧 sc 100 μ L 细胞悬液, 待皮下瘤形成后给药。期间各组裸鼠正常饮食饮水, 每间隔 1 d 测量各组裸鼠皮下瘤大小、体质量, 计算肿瘤相对体积; 给药后第 15 天结束实验, 取出皮下瘤、计算皮下瘤肿瘤体积、拍照, 并收集各组裸鼠心、肝、肺和肾组织。

$$\text{肿瘤体积} = 1/2 \times \text{长径} \times \text{宽径}^2$$

$$\text{肿瘤相对体积} = \text{当天肿瘤体积} / \text{第 1 天肿瘤体积}$$

2.11 苏木素-伊红(hematoxylin-eosin staining, HE)染色

心、肝、肺、肾和肿瘤组织样本固定在 4%多聚

甲醛中, 通过梯度乙醇脱水, 二甲苯透明, 石蜡包埋、切片, 脱蜡、脱苯、PBS 清洗、随后按照 HE 染色试剂盒说明书进行染色, 再次脱水、透明、中性树胶封片后, 于显微镜下观察并拍照。

2.12 免疫组化染色(immunohistochemistry, IHC)

制备肿瘤组织石蜡切片、烘烤、脱蜡、梯度乙醇脱苯、PBS 洗涤, 一抗 Ki67(1:2 000)、xCT(1:200)和 GPX4(1:200)4 °C 孵育过夜, 二抗继续孵育, DAB 显色和苏木素复染后, 脱水、透明、中性树胶封片后显微镜下观察, 拍照, Image J 软件进行结果分析。

2.13 统计学分析

采用 SPSS 25.0 软件进行统计学分析, 以 $\bar{x} \pm s$ 表示。对于符合正态分布且方差齐性的数据, 使用单因素方差分析 LSD 法进行两两比较, 对于仅符合正态分布但不满足方差齐性的数据, 采用 Welch 单因素方差分析。若数据不符合正态分布, 则采用 Kruskal-Wallis 非参数检验。

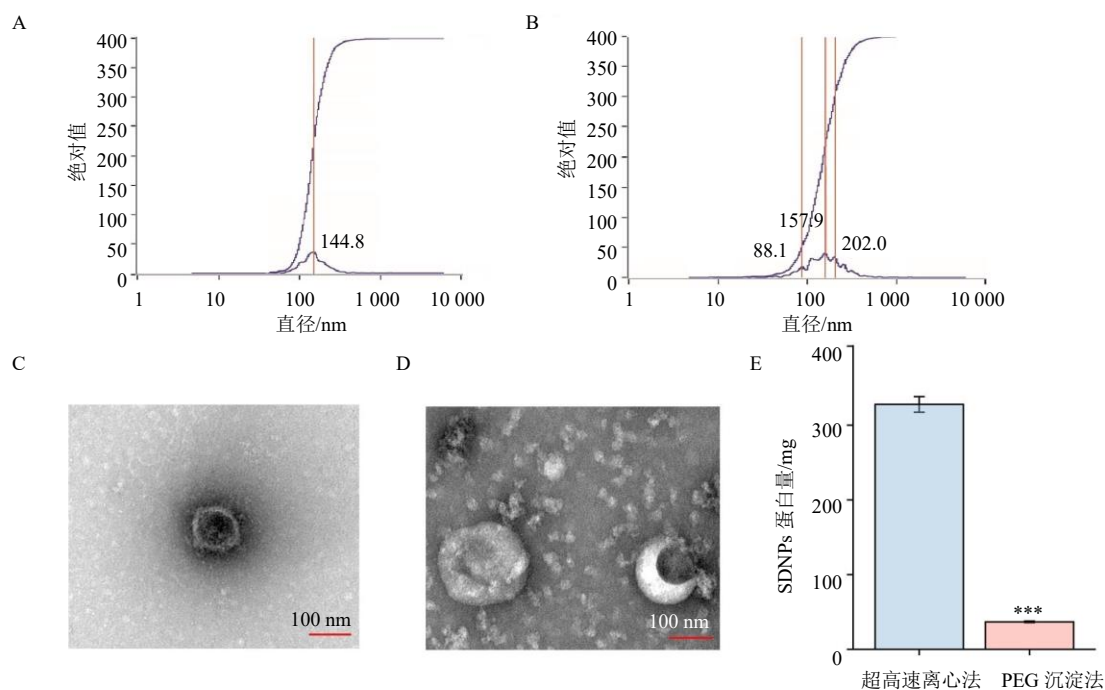
3 结果

3.1 SDNPs 表征检测

NTA 检测结果显示, 超高速离心法提取的 SDNPs 的粒径均值为 (144.8 $\pm$ 79.7) nm, 粒径占比为 100% (图 1-A); PEG 沉淀法提取的 SDNPs 粒径均值分别为 88.1、157.9 和 202.0 nm, 粒径占比分别为 49.8%、13.6%和 18.1% (图 1-B)。TEM 结果显示, 与超高速离心法比较, PEG 沉淀法获得的 SDNPs 粒径差异较大, 且杂质较多 (图 1-C、D)。BCA 蛋白定量 2 种提取方法纯化后的 SDNPs, 如图 1-E 所示, 通过超高速离心法获得的 SDNPs 蛋白质量为 339.60 mg, 而 PEG 沉淀法获得的 SDNPs 蛋白质量为 36.58 mg, 2 种提取方法 SDNPs 获得量具有显著差异 ($P < 0.001$), 且 PEG 沉淀法提取的 SDNPs 杂质显著多于超高速离心法。综上所述, 超高速离心法提取特异性优于 PEG 沉淀法, 因此后续实验均通过超高速离心法提取 SDNPs。

3.2 SDNPs 可被 SK-Hep-1 细胞摄取

SDNPs 的活性成分主要有脂质、蛋白和核酸, 通过细胞胞吞在细胞内发生生物学作用, 因此, 癌细胞是否摄取 SDNPs 十分重要。DiI 染料是一种亲脂性染料, 能够对拥有脂质膜结构的囊泡进行染色^[16]。如图 2 所示, 外泌体组的 SK-Hep-1 细胞中发现明显的颗粒状红色荧光, 而对照组则未发现类似荧光信号, 表明 SK-Hep-1 细胞能够摄取 SDNPs。



A-超高速离心法 SDNPs 粒径; B-PEG 沉淀法 SDNPs 粒径; C-超高速离心法 SDNPs 形态; D-PEG 沉淀法 SDNPs 形态; E-2 种提取方法获得的 SDNPs 蛋白质量, 与超高速离心法比较: *** $P < 0.001$ 。

A-particle size of SDNPs by ultracentrifugation; B-particle size of SDNPs by PEG precipitation; C-morphology of SDNPs by ultracentrifugation; D-morphology of SDNPs by PEG precipitation; E-protein content of SDNPs from both extraction methods, *** $P < 0.001$ vs ultracentrifugation.

图 1 SDNPs 提取及表征鉴定 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 1 Extraction and characterization of SDNPs ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

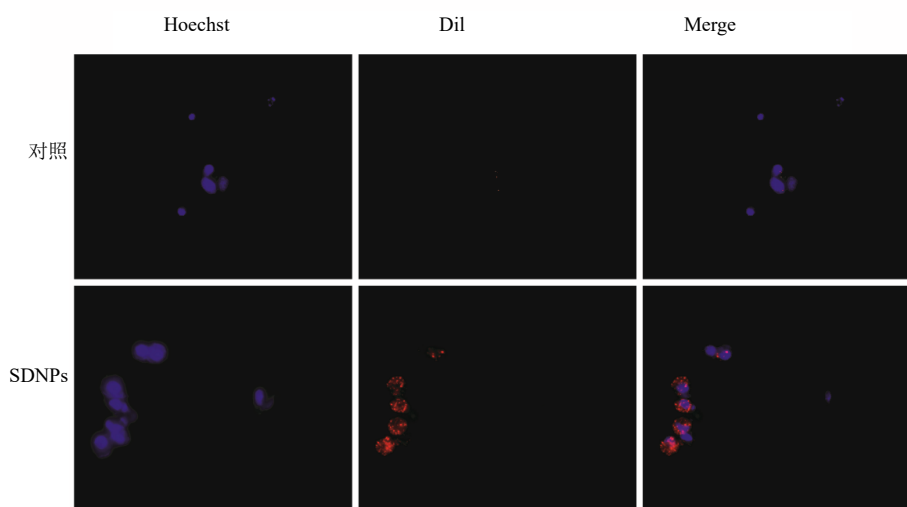


图 2 SK-Hep-1 细胞摄取 SDNPs ($\times 400$)

Fig. 2 Uptake of SDNPs by SK-Hep-1 cells ($\times 400$)

3.3 不同质量浓度 SDNPs 对 SK-Hep-1 细胞存活率的影响

如图 3 所示, 与对照组比较, 用含 1.875、3.750、7.500 $\mu\text{g/mL}$ SDNPs 的细胞培养液分别干预 SK-Hep-1 细胞 24、48 和 72 h 均未对细胞

存活率产生显著影响。当 SDNPs 质量浓度达到 15 $\mu\text{g/mL}$ 时, 3 种干预时间下细胞存活率均出现显著下降 ($P < 0.05$ 、0.001), 且细胞存活率随 SDNPs 质量浓度增加而显著下降 ($P < 0.05$ 、0.001)。

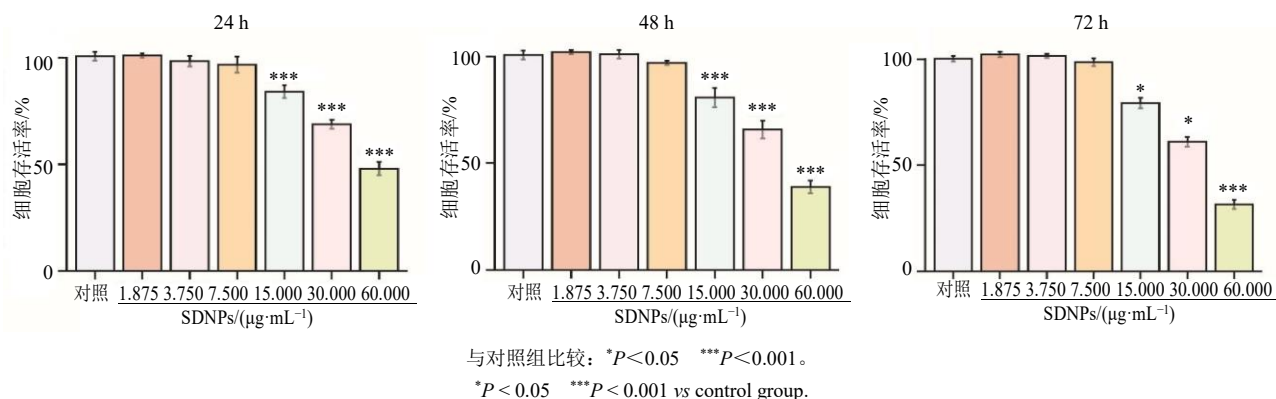


图 3 不同质量浓度 SDNPs 干预 24、48、72 h 后 SK-Hep-1 细胞存活率 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

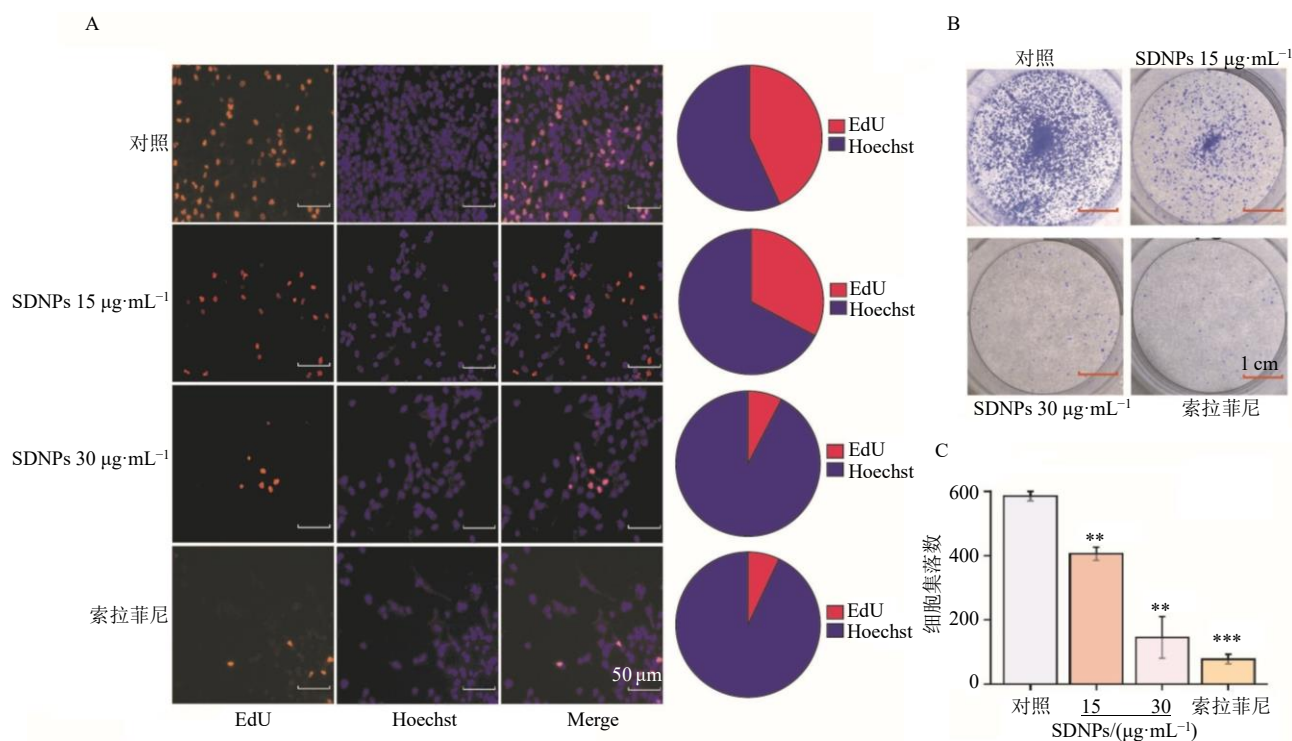
Fig. 3 Viability of SK-Hep-1 cells after 24, 48, and 72 h intervention with different concentrations of SDNPs ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

3.4 SDNPs 抑制 SK-Hep-1 肝癌细胞增殖

如图 4-A 所示, 与对照组比较, SDNPs 低、高剂量组和索拉非尼组的增殖细胞数量减少。如图 4-B、C 所示, 与对照组比较, SDNPs 低、高剂量组和索拉非尼组细胞集落数显著减少 ($P < 0.01$ 、 0.001)。

3.5 SDNPs 抑制肝癌细胞 SK-Hep-1 迁移和侵袭

如图 5-A 所示, 与对照组比较, 48 h 后 SDNPs 低、高剂量组和索拉非尼组 SK-Hep-1 细胞的划痕面积明显增加 ($P < 0.05$ 、 0.01)。如图 5-B、C 所示, 与对照组比较, SDNPs 低、高剂量和索拉非尼均能显著减少通过基质胶的 SK-Hep-1 细胞数量 ($P < 0.001$),



A-EdU 法检测细胞增殖 ($\times 200$), EdU 标记增殖细胞 (红色), DAPI 标记活细胞 (蓝色); B、C-平板克隆实验检测细胞增殖, 与对照组比较: ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$ 。

A-EdU assay for cell proliferation ($\times 200$), EdU labels proliferating cells (red), while DAPI marks living cells (blue); B, C-colony formation assay for cell proliferation evaluation, ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$ vs control group.

图 4 SDNPs 对 SK-Hep-1 细胞增殖的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 4 Effect of SDNPs on SK-Hep-1 proliferation ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

表明 SDNPs 能够抑制肝癌细胞 SK-Hep-1 迁移和侵袭。

3.6 SDNPs 诱导 SK-Hep-1 细胞死亡的类型

如图 6-A 所示, 与对照组比较, SDNPs 低、高剂量组和索拉非尼组 SK-Hep-1 凋亡细胞比例增加, 表明 SDNPs 能够诱导 SK-Hep-1 细胞发生凋亡。如图 6-

B 所示, 3 种抑制剂均能部分抑制 SDNPs 对 SK-Hep-1 的细胞毒性, 其中 SDNPs+ZVF 和 SDNPs+Fer-1 组的细胞毒性抑制作用明显 ($P<0.05$ 、 0.01), 且 SDNPs+Fer-1 组的细胞存活率高于 SDNPs+ZVF 组, 结果表明, 铁死亡可能是 SDNPs 诱导 SK-Hep-1 细胞死亡的主要方式之一。

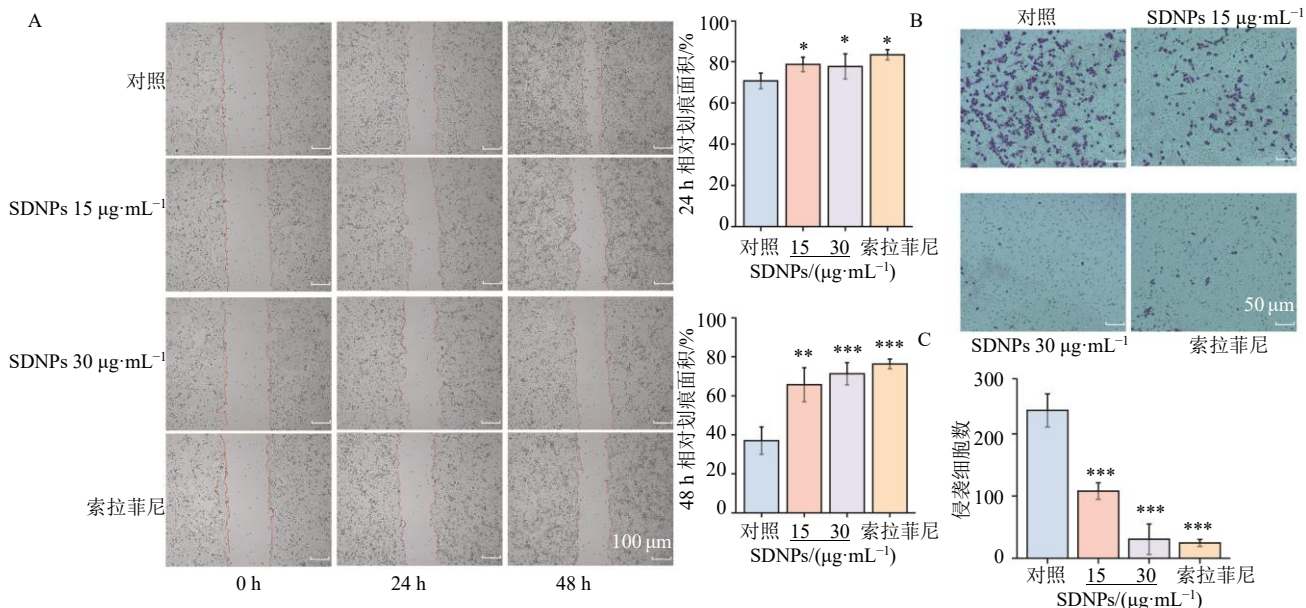


图 5 SDNPs 对 SK-Hep-1 细胞迁移和侵袭的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)
Fig. 5 Effects of SDNPs on cell migration and invasion of SK-Hep-1 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

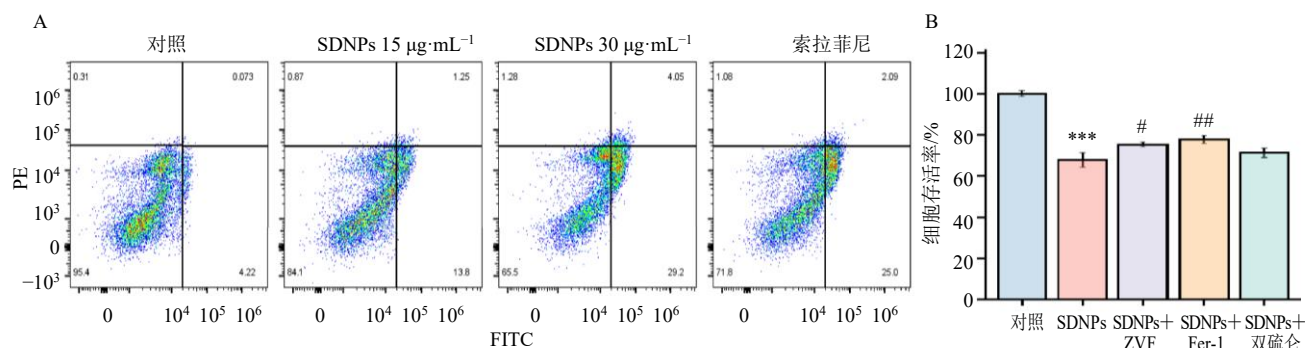
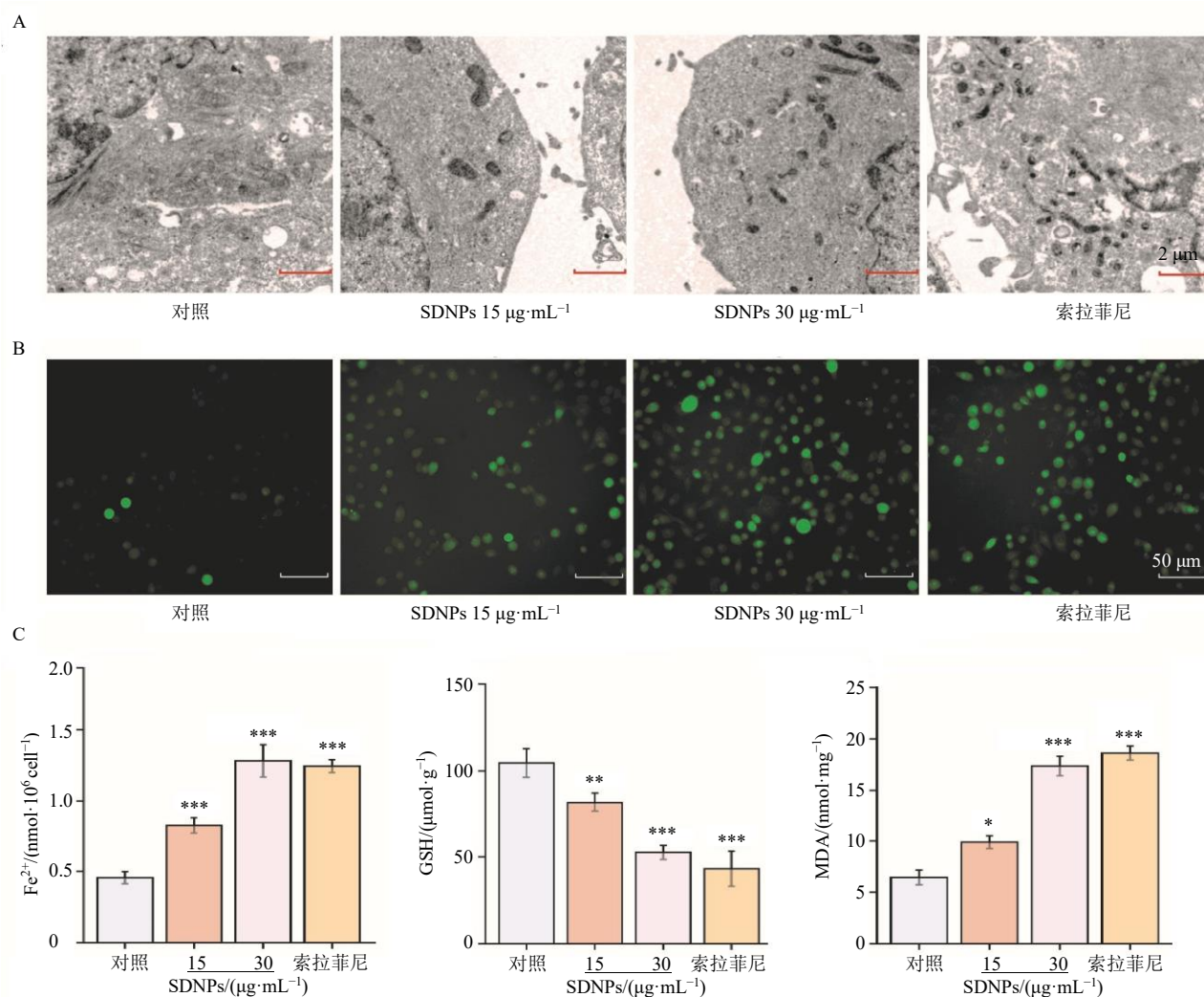


图 6 不同浓度 SDNPs 对 SK-Hep-1 细胞死亡的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)
Fig. 6 Effect of different concentrations of SDNPs on SK-Hep-1 cell death ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

3.7 SDNPs 诱导肝癌细胞铁死亡

如图 7-A 所示, 对照组线粒体结构正常, 形态大小正常, 线粒体膜饱满, 线粒体密度适中; SDNPs 低、高剂量组和索拉非尼组的线粒体出现形态皱缩,

密度增加, 嵴减少等表现, 提示 SDNPs 能够促进 SK-Hep-1 细胞线粒体功能破坏, 可能与细胞铁死亡的发生有关。如图 7-B、C 所示, 与对照组比较, SDNPs 和索拉非尼干预后, 细胞内 ROS 及 Fe^{2+} 、



A-各组细胞线粒体形态; B-ROS 荧光 ($\times 200$); C- Fe^{2+} 、GSH、MDA 水平; 与对照组比较: * $P<0.05$ ** $P<0.01$ *** $P<0.001$ 。
A-mitochondrial morphology in each group; B-fluorescence of ROS ($\times 200$); C-levels of Fe^{2+} , GSH and MDA; * $P<0.05$ ** $P<0.01$ *** $P<0.001$ vs control group.

图 7 SDNPs 对 SK-Hep-1 细胞铁死亡的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)
Fig. 7 Effect of SDNPs on ferroptosis of SK-Hep-1 cells ($\bar{x} \pm s, n=3$)

MDA 水平均显著升高 ($P<0.05$ 、 0.001)，GSH 水平显著降低 ($P<0.01$ 、 0.001)。结果表明，SDNPs 可能通过增加细胞内亚铁离子和 ROS 的含量，并抑制过氧化物酶的活性，导致细胞内过氧化物的积累，从而诱导 SK-Hep-1 细胞发生铁死亡。

如图 8 所示，与对照组比较，SDNPs 低、高剂量组和索拉菲尼组细胞中 xCT 和 GPX4 蛋白的表达下调，其中，SDNPs 高剂量组和索拉菲尼组细胞的 xCT 蛋白表达显著下调 ($P<0.01$ 、 0.001)，索拉菲尼组的 GPX4 蛋白表达显著下调 ($P<0.05$)；此外，与对照组比较，SDNPs 低、高剂量组和索拉菲尼组细胞铁死亡阳性蛋白 ACSL4 表达显著上调 ($P<0.001$)。综上，SDNPs 能够通过

下调 xCT 和 GPX4 蛋白，上调 ACSL4 蛋白表达，导致脂质过氧化物积累，从而诱导肝癌细胞发生铁死亡。

3.8 SDNPs 对肝癌裸鼠皮下移植瘤的影响

如图 9-A 所示，与对照组比较，除 SDNPs-ip 组外，其他各组裸鼠皮下肿瘤的生长情况均有减缓 ($P<0.001$)，推测 SDNPs 直接入血对 SK-Hep-1 皮下移植瘤的抑制作用阈浓度更低。如图 9-B 所示，索拉菲尼组裸鼠体质量下降较为明显 ($P<0.05$)，而 SDNPs 各组与石见穿组裸鼠体质量下降幅度较为缓慢。如图 9-C 所示，与对照组比较，其他各组移植瘤大小均减小，石见穿组、SDNPs-ip、tiv 组和索拉菲尼组移植瘤体积显著减小 ($P<0.05$ 、 0.01)。

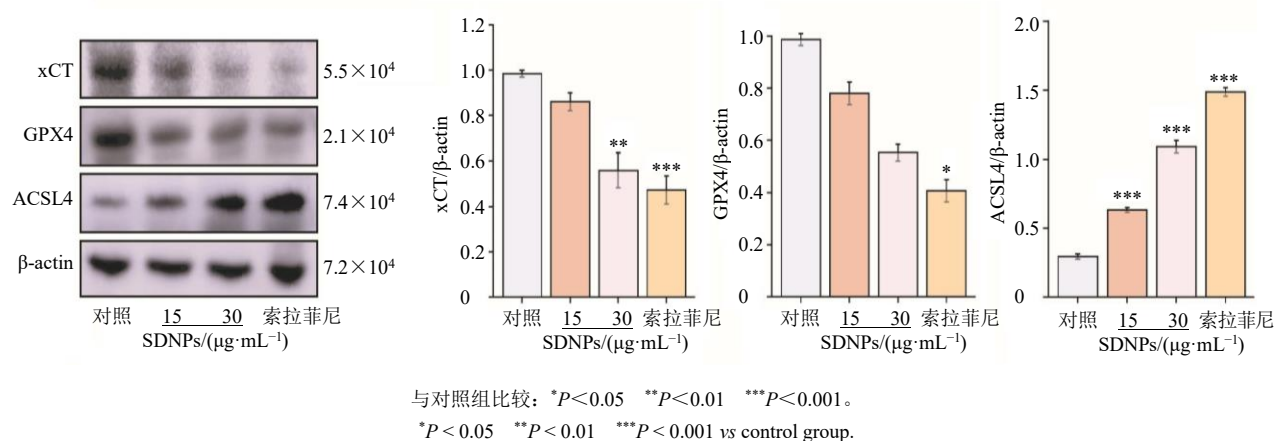
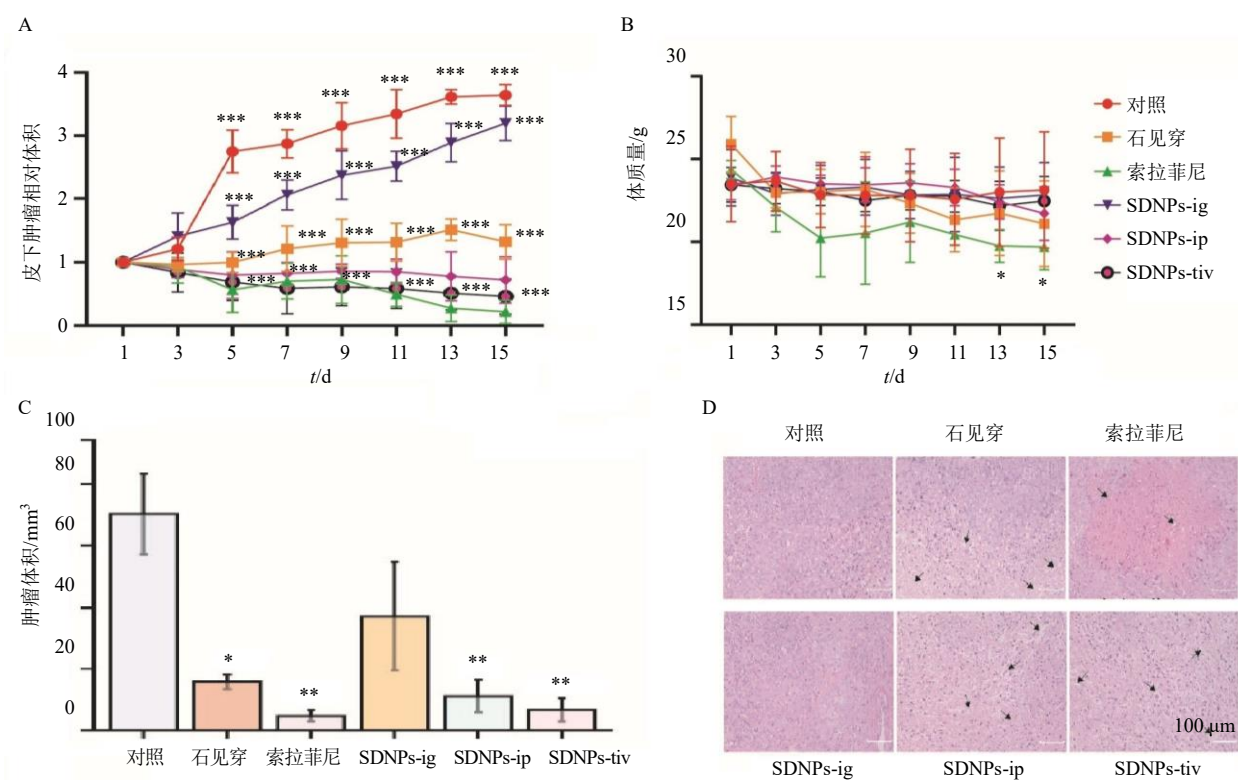


图 8 SDNPs 对 SK-Hep-1 细胞中铁死亡相关蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 8 Effect of SDNPs on ferroptosis-related protein expressions in SK-Hep-1 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)



A-给药 1~15 d 皮下肿瘤相对体积比较; B-裸鼠体重; C-给药结束后各组肿瘤体积, 与对照组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$; D-皮下瘤 HE 染色结果 ($\times 200$)。

A- comparison of relative volume of subcutaneous tumors from 1—15 d after administration; B-body weight of nude mice; C-tumor volume in each group after administration, * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs control group; D-HE staining results of subcutaneous tumors ($\times 200$).

图 9 SDNPs 对裸鼠肝癌皮下移植瘤的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 4$)

Fig. 9 Effect of SDNPs on subcutaneous hepatocellular carcinoma tumors in nude mice ($\bar{x} \pm s, n = 4$)

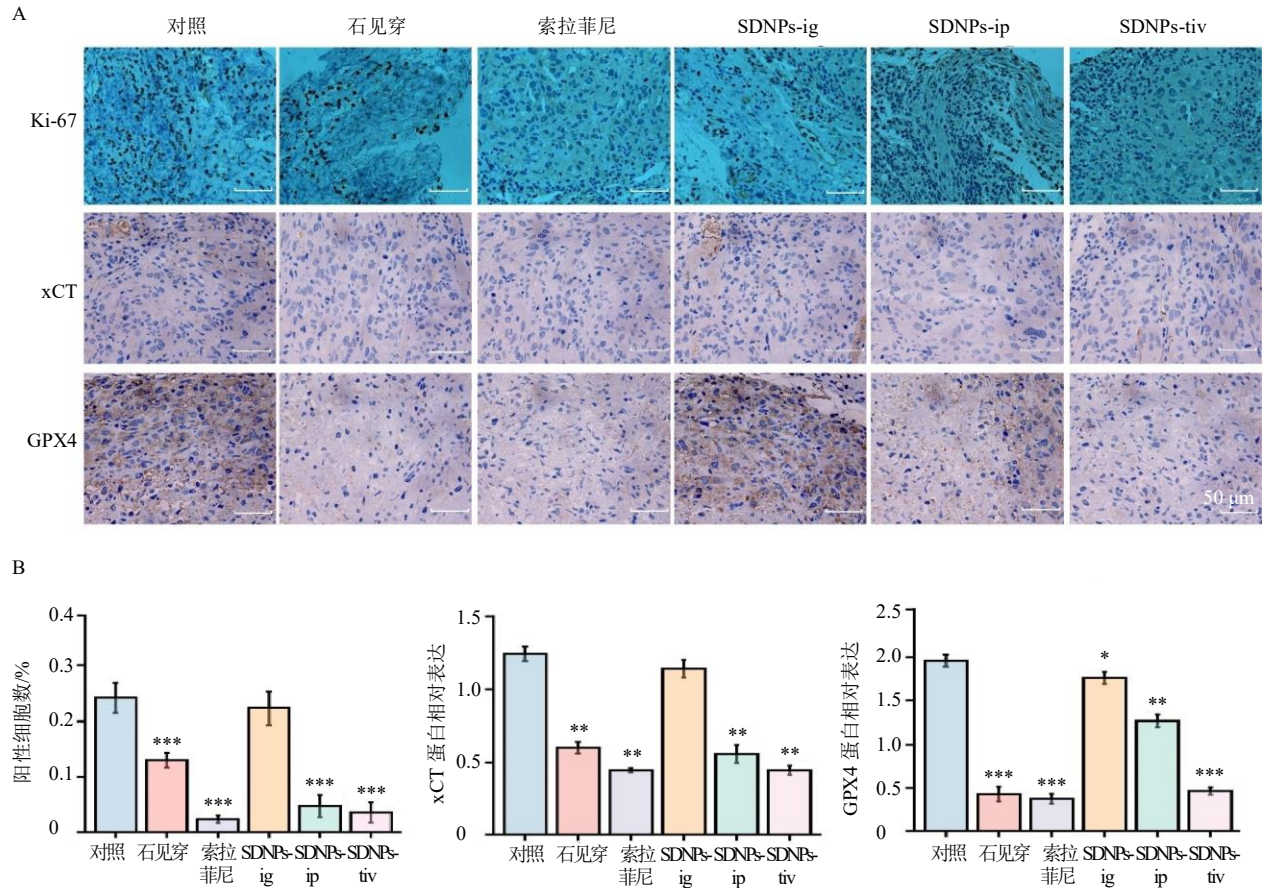
HE 染色结果发现, 对照组肿瘤细胞核染色深, 细胞肥大, 胞质丰富, 偶见多核细胞, 增殖旺盛, 排列紧密, 细胞间边界清晰, 而石见穿组和 SDNPs-ip、-tiv 组以及索拉菲尼组中, 癌细胞分散, 密度降

低, 细胞破裂, 细胞质渗漏, 大量空泡结构, 细胞核明显凝聚、碎裂和溶解 (图 9-D)。

Ki67 是经典的增殖相关蛋白, 能维持细胞分裂时染色体分散, 在病理研究中被广泛用作肿瘤标志

物,对多种癌症有预后与诊断价值,与肿瘤密切相关^[17]。Ki67 在部分正常组织中几乎不表达^[18],而在肿瘤组织中更易检测到 Ki67。如图 10 所示,与对照组比较,SDNPs-ig 组 Ki67 阳性细胞数无显著变

化,其他组 Ki67 阳性细胞数均显著减少 ($P < 0.001$);与对照组比较,SDNPs-ig 组 xCT 蛋白表达差异无统计学意义,而其他组肿瘤组织中 xCT、GPX4 的表达均显著下降 ($P < 0.05$ 、 0.01 、 0.001)。



A-IHC 检测肿瘤组织 Ki-67 阳性细胞数及 xCT、GPX4 蛋白表达 ($\times 200$); B-各组肿瘤组织中 Ki-67 阳性细胞数及 xCT、GPX4 蛋白表达,与对照组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$ 。

A-number of Ki-67 positive cells and expressions of xCT and GPX4 were detected by IHC ($\times 200$), B-number of Ki-67 positive cells and expressions of xCT and GPX4 in each group, * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$ vs control group.

图 10 SDNPs 抑制肝癌皮下移植瘤增殖 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 10 Inhibitory proliferation of subcutaneous hepatocellular carcinoma implantation tumors by SDNPs ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

3.9 SDNPs 具有一定的生物安全性

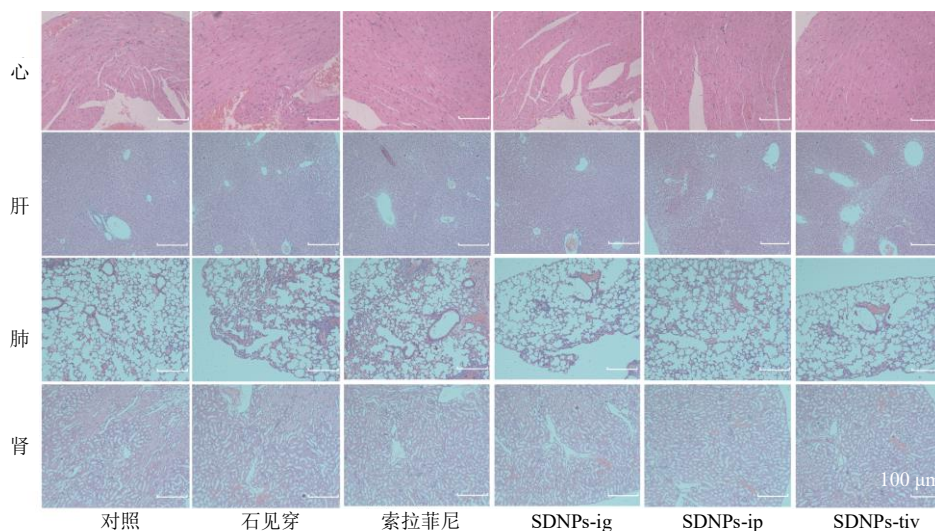
为证明 SDNPs 是否具有生物安全性,对裸鼠心、肝、肺和肾组织进行了 HE 染色。如图 11 所示,对照组和 SDNPs 组裸鼠各器官组织结构均正常,细胞形态良好,未发现有肿瘤转移现象,表明 SDNPs 具有一定的生物安全性。

4 讨论

肝癌是发源于人体肝细胞或肝内胆管上皮细胞的恶性肿瘤。肝癌在中医经典中没有准确的病名,古代医家将肝癌归结为“脾积”“肝积”“鼓胀”“积聚”“黄疸”等病证范畴^[19]。肝癌的核心病机为“癌

毒、瘀血、脾虚”,治疗应以“清热解毒、化痰软坚、健脾理气”为治则,辅以清热利湿、清肝利胆、消食健脾、通利二便、补肝强肾等治法^[12]。

研究表明,石见穿及其提取物具有十分显著的抗肿瘤作用,对乳腺癌、肝癌等诸多恶性肿瘤具有显著疗效^[20-22]。林鑫荣等^[23]发现,石见穿能够显著抑制食管癌小鼠病情进展,使原位癌小鼠食管变细,结节减少,并诱导肿瘤组织铁死亡。杨健等^[24],对石见穿多糖进行研究发现,石见穿多糖能够抑制小鼠骨肉瘤的生长,并通过调节小鼠外周血淋巴细胞分群,增强小鼠抗肿瘤免疫。黄雯洁等^[25],对石见穿进行了质谱分

图 11 SDNPs 生物安全性 ($\times 100$)Fig. 11 Biosafety of SDNPs ($\times 100$)

析, 共分析得到 48 种化学成分, 其中包括丹参素、迷迭香酸、山柰酚等具有抗肿瘤作用的单体。

细胞外囊泡是由细胞分泌的各种类型囊泡的总称, 具有磷脂膜结构, 能够作为载体, 参与细胞间通讯^[26]。国际细胞外囊泡协会将直径为 30~150 nm 的含有脂质、蛋白质、核酸的细胞外囊泡定义为外泌体^[27]。植物外泌体近年来, 越发受到研究者的关注, 植物外泌体的直径一般在 30~300 nm^[6]。研究发现, 生姜外泌体可降低小鼠结肠癌模型中细胞周期蛋白 D1 mRNA 水平, 发挥抗肿瘤作用^[28]; 柠檬外泌体能激活 TNF 相关凋亡配体介导的细胞凋亡, 抑制慢性粒细胞白血病的恶化^[29]。

目前植物外泌体的提取方法主要有超速离心法、PEG 沉淀法、尺寸排阻色谱法等, 其中超速离心法为最常用的方法, 该方法主要包括差速离心和密度梯度离心, 差速离心可以去除植物中的纤维、泥土以及其他非细胞外囊泡的杂质, 密度梯度离心则可以根据外泌体与其他囊泡以及杂质的密度差异, 实现外泌体的纯化。目前人参、西兰花、葡萄柚、生姜等多种植物的外泌体均使用超速离心法提取^[30-33], 该方法具有操作简单、纯度高的优点, 但其步骤繁琐, 耗时长, 仪器价格昂贵, 需要考虑对仪器的损耗, 不适合频繁使用, 且实验重现率低, 同样转速和离心时间在不同转子及参数进行离心均可导致外泌体产量和纯度出现误差。另外, 长时间多次离心也会导致外泌体囊泡的破裂, 影响外泌体的产量^[34-35]。PEG 沉淀法主要以 PEG 为介质, PEG 能与疏水性脂

质和蛋白结合, 形成大分子聚合物沉降, 由于外泌体是拥有类似细胞膜的膜性囊泡, 能够被 PEG 吸附, 导致溶解度降低, 形成 PEG-外泌体聚合物沉淀^[36]。PEG 沉淀法具有提取成本低, 提取效率高的优点, 适合大体积样本的外泌体提取^[37]。但提取的外泌体纯度差、PEG 清除难是有待解决的问题^[38]。

本研究首先比较了超速离心法和 PEG 沉淀法 2 种外泌体提取方法的 SDNPs 纯度和得率, 发现 2 种方法均可以成功提取 SDNPs, 但超高速离心法能够获得更高纯度和浓度的 SDNPs。通过摄取实验发现, 肝癌细胞能够直接摄取 SDNPs, 并且 SDNPs 能明显抑制 SK-Hep-1 细胞增殖、迁移和侵袭能力, 同时诱导细胞凋亡和铁死亡。

铁死亡是与细胞坏死、凋亡和自噬不同的新型细胞程序性死亡方式。铁离子在铁死亡过程中发挥关键作用, 铁离子进入细胞后会被还原为 Fe^{2+} , 与其他胞内物质形成铁离子复合物, 参与细胞各种生化反应, 而过多的铁摄入会导致 Fe^{2+} 在胞内积累, 不稳定的铁离子会增强细胞芬顿反应, 增加 ROS 的产生和脂质过氧化物积累, 进而导致细胞死亡^[10]。xCT 蛋白是由底物特异性轻链 xCT 和重链 SLC3 家族 II 型跨膜糖蛋白组成的一种氨基酸反转运蛋白, 能以 1:1 的比例交换细胞外的胱氨酸和细胞内的谷氨酸^[39-40], xCT 可将胞外胱氨酸还原为半胱氨酸, 用于合成 GSH。GSH 是 GPX4 的主要供体^[41], GPX4 是细胞内脂质过氧化物代谢的关键酶, GPX4 的耗竭会导致细胞氧化应激和铁死亡的发生。SDNPs 干

预后的 SK-Hep-1 细胞线粒体出现形态皱缩、密度增加和嵴减少,与对照组比较,SDNPs 干预后的肝癌细胞内 ROS 及 Fe^{2+} 、MDA 的水平显著升高,GSH 水平减少,提示 SDNPs 干预后的肝癌细胞内不稳定铁离子增多,过氧化物增加,细胞抗氧化能力减弱。SDNPs 和索拉非尼干预后的肝癌细胞与对照组比较,xCT、GPX4 表达显著下调,ACSL4 表达显著上调。ACSL4 是一种将脂肪酸转化为脂肪酰辅酶 A 酯的酶,可调节细胞内脂质合成,而铁死亡的关键特征就是铁依赖性过氧化脂质积累,因此 ACSL4 与铁死亡密切相关^[42]。索拉非尼可以诱导多种癌细胞的铁死亡^[43-44],因此,本研究以索拉非尼作为铁死亡阳性对照药。

与对照组比较,石见穿组、索拉非尼组和 SDNPs-ip、tiv 组肝癌皮下移植瘤平均体积均有降低,而 SDNPs-ig 组肿瘤体积无显著差异,可能与生物首过效应和药物浓度有关。研究发现,放置温度越高、时间越长对外泌体保存越不利^[45],SDNPs 提取制备过程中的高温可能大量损耗外泌体,但其仍然具有明显的抗肿瘤作用,表明石见穿中所含的某些活性成分具有抗肿瘤功效。SDNPs-ip、tiv 组和索拉非尼组小鼠肿瘤组织出现坏死,并伴有核减少、破碎和空泡样变化,而小鼠心、肝、肺、肾等器官并未发现显著病理变化,表明 SDNPs 具有靶向治疗肿瘤的作用,且具有一定的生物安全性。

综上,SDNPs 能够被肝癌细胞 SK-Hep-1 摄取并抑制其增殖、迁移和侵袭;能诱导肝癌皮下移植瘤发生铁死亡,抑制肿瘤生长,并且具有一定的生物安全性。本研究考察了 SDNPs 的抗肿瘤作用和生物安全性,后续还应深入探究 SDNPs 抗肿瘤作用的其他相关机制,以期 SDNPs 作为抗肿瘤潜在药物的药理学研究和临床应用提供参考。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Han B F, Zheng R S, Zeng H M, *et al.* Cancer incidence and mortality in China, 2022 [J]. *J Natl Cancer Cent*, 2024, 4(1): 47-53.
- [2] 郭若闻, 杨森, 曹林, 等. 原发性肝癌的中西医结合治疗进展 [J]. *中西医结合肝病杂志*, 2019, 29(6): 573-576.
- [3] 赵楷波, 陈达满, 陈正义, 等. 中医药结合化疗治疗原发性肝癌研究进展 [J]. *中西医结合肝病杂志*, 2024, 34(1): 93-96.
- [4] Li Z, Hao E, Cao R, *et al.* Analysis on internal mechanism of zedoary turmeric in treatment of liver cancer based on pharmacodynamic substances and pharmacodynamic groups [J]. *Chin Herb Med*, 2022, 14(4): 479-493.
- [5] 潘林思, 王文彩, 姚孟宇, 等. 植物源外泌体样纳米颗粒及其应用研究进展 [J]. *中国中药杂志*, 2023, 48(22): 5977-5984.
- [6] 赵梦, 李思敏, 张蕾, 等. 植物来源囊泡及其生物医学应用研究进展 [J]. *药学学报*, 2021, 56(8): 2039-2047.
- [7] 张盈盈, 陈丽青, 刘璇, 等. 外泌体作为药物递送载体的研究进展 [J]. *药学学报*, 2019, 54(6): 1010-1016.
- [8] Jiang X C, Gao J Q. Exosomes as novel bio-carriers for gene and drug delivery [J]. *Int J Pharm*, 2017, 521(1/2): 167-175.
- [9] Dolma S, Lessnick S L, Hahn W C, *et al.* Identification of genotype-selective antitumor agents using synthetic lethal chemical screening in engineered human tumor cells [J]. *Cancer Cell*, 2003, 3(3): 285-296.
- [10] Henning Y, Blind U S, Larafa S, *et al.* Hypoxia aggravates ferroptosis in RPE cells by promoting the Fenton reaction [J]. *Cell Death Dis*, 2022, 13(7): 662.
- [11] 武美, 倪育淳. 倪育淳运用石见穿治疗肺癌的临床经验 [J]. *中国民间疗法*, 2023, 31(4): 34-37.
- [12] 翦慧颖, 李克雄, 曾普华. 实脾消积饮含药血清对肝癌 HepG2 细胞线粒体动力学平衡和铁死亡的影响 [J]. *中医杂志*, 2024, 65(6): 609-617.
- [13] 蔡锡潮, 周海玲, 覃军, 等. 石见穿多糖注射液对 Lewis 肺癌小鼠肿瘤抑制率研究 [J]. *亚太传统医药*, 2015, 11(1): 14-15.
- [14] 罗浚嘉. 生姜外泌体抗结直肠癌作用及机制研究 [D]. 长沙: 中南大学, 2022.
- [15] Ou X, Wang H, Tie H, *et al.* Novel plant-derived exosome-like nanovesicles from *catharanthus roseus*: Preparation, characterization, and immunostimulatory effect via TNF- α /NF- κ B/PU.1 axis [J]. *J Nanobiotechnology*, 2023, 21(1): 160.
- [16] Liu Y, Wang X, Li J, *et al.* Sphingosine 1-phosphate liposomes for targeted nitric oxide delivery to mediate anticancer effects against brain glioma tumors [J]. *Adv Mater*, 2021, 33(30): e2101701.
- [17] Kreipe H, Harbeck N, Christgen M. Clinical validity and clinical utility of Ki67 in early breast cancer [J]. *Ther Adv Med Oncol*, 2022, 14: 17588359221122725.
- [18] Zhang A L, Wang X J, Fan C F, *et al.* The role of Ki67 in evaluating neoadjuvant endocrine therapy of hormone receptor-positive breast cancer [J]. *Front Endocrinol*, 2021, 12: 687244.
- [19] 李佳颖, 曾普华. 曾普华基于“癌毒致病”和“方证辨证”治疗肝癌临床经验 [J]. *亚太传统医药*, 2022, 18(5): 107-110.
- [20] Wang N, Tan H Y, Chan Y T, *et al.* Identification of WT1

- as determinant of hepatocellular carcinoma and its inhibition by Chinese herbal medicine *Salvia chinensis* Benth and its active ingredient protocatechualdehyde [J]. *Oncotarget*, 2017, 8(62): 105848-105859.
- [21] Wang K N, Hu Y, Han L L, *et al.* *Salvia chinensis* Benth inhibits triple-negative breast cancer progression by inducing the DNA damage pathway [J]. *Front Oncol*, 2022, 12: 882784.
- [22] 梁伟, 王松坡. 石见穿的药用成份及在抗肿瘤方面的研究 [J]. 现代肿瘤医学, 2014, 22(10): 2492-2494.
- [23] 林鑫荣, 贾蕾, 李丽峰, 等. 石见穿诱导铁死亡抑制小鼠食管癌发生发展的研究 [J]. 中国全科医学, 2024, 27(30): 3784-3789.
- [24] 杨健, 张立喜, 史博. 石见穿多糖通过 PTEN 通路对骨肉瘤小鼠的抑瘤作用及对免疫功能的影响 [J]. 天津中医药, 2022, 39(7): 940-944.
- [25] 黄雯洁, 阮帅, 温芳, 等. 基于 HPLC-Q-TOF-MS/MS 技术的石见穿化学成分分析及其治疗胃癌的网络药理学探究 [J]. 四川大学学报: 自然科学版, 2020, 57(6): 1198-1208.
- [26] 张雪萍, 鲁雨晴, 张月倩, 等. 植物细胞外囊泡及其分析技术的进展 [J]. 生物技术通报, 2023, 39(5): 32-43.
- [27] 张馨月, 胡克. 植物外泌体的抗炎抗癌机制研究进展 [J]. 武汉大学学报: 医学版, 2023, 44(11): 1410-1414.
- [28] 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.
- [29] 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.
- [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.
- [31] Wang B M, Zhuang X Y, Deng Z B, *et al.* Targeted drug delivery to intestinal macrophages by bioactive nanovesicles released from grapefruit [J]. *Mol Ther*, 2014, 22(3): 522-534.
- [32] Deng Z B, 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.
- [33] 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.
- [34] Yang X X, Sun C, Wang L, *et al.* New insight into isolation, identification techniques and medical applications of exosomes [J]. *J Control Release*, 2019, 308: 119-129.
- [35] Böing A N, van der Pol E, Grootemaat A E, *et al.* Single-step isolation of extracellular vesicles by size-exclusion chromatography [J]. *J Extracell Vesicles*, 2014, 3: 10.
- [36] 陈晓峰, 王开元, 梁芳铭, 等. 外泌体递药系统及其在肿瘤治疗中的应用 [J]. 化学进展, 2022, 34(4): 773-786.
- [37] Yin L F, Yan L, Yu Q, *et al.* Characterization of the microRNA profile of ginger exosome-like nanoparticles and their anti-inflammatory effects in intestinal caco-2 cells [J]. *J Agric Food Chem*, 2022, 70(15): 4725-4734.
- [38] Kalarikkal S P, Prasad D, Kasiappan R, *et al.* A cost-effective polyethylene glycol-based method for the isolation of functional edible nanoparticles from ginger rhizomes [J]. *Sci Rep*, 2020, 10(1): 4456.
- [39] Sato H, Tamba M, Ishii T, *et al.* Cloning and expression of a plasma membrane cystine/glutamate exchange transporter composed of two distinct proteins [J]. *J Biol Chem*, 1999, 274(17): 11455-11458.
- [40] Bannai S. Exchange of cystine and glutamate across plasma membrane of human fibroblasts [J]. *J Biol Chem*, 1986, 261(5): 2256-2263.
- [41] Zheng J S, Conrad M. The metabolic underpinnings of ferroptosis [J]. *Cell Metab*, 2020, 32(6): 920-937.
- [42] Wang Y, Zhang M H, Bi R, *et al.* ACSL4 deficiency confers protection against ferroptosis-mediated acute kidney injury [J]. *Redox Biol*, 2022, 51: 102262.
- [43] Lachiaier E, Louandre C, Godin C, *et al.* Sorafenib induces ferroptosis in human cancer cell lines originating from different solid tumors [J]. *Anticancer Res*, 2014, 34(11): 6417-6422.
- [44] Sun X, Niu X, Chen R, *et al.* Metallothionein-1G facilitates sorafenib resistance through inhibition of ferroptosis [J]. *Hepatology*, 2016, 64(2): 488-500.
- [45] Sokolova V, Ludwig A K, Hornung S, *et al.* Characterisation of exosomes derived from human cells by nanoparticle tracking analysis and scanning electron microscopy [J]. *Colloids Surf B Biointerfaces*, 2011, 87(1): 146-150.

[责任编辑 罗 曦]