

## 柑橘属植物来源的外泌体样纳米颗粒及其疾病治疗研究进展

韩菲<sup>1,4</sup>, 马小梅<sup>1,4</sup>, 石旭柳<sup>2,4</sup>, 孙延文<sup>1,4</sup>, 周妍<sup>2,4</sup>, 张润<sup>1,4</sup>, 邱峰<sup>2,3,4</sup>, 丁丽琴<sup>1,3,4\*</sup>

1. 天津中医药大学中医药研究院, 天津 301617
2. 天津中医药大学中药学院, 天津 301617
3. 天津市中药功效物质重点实验室, 天津 301617
4. 现代中药创制全国重点实验室, 天津 301617

**摘要:** 外泌体是一种直径为 30~150 nm 的细胞外囊泡, 在调节细胞间通讯和影响多种疾病进展方面具有重要作用。柑橘属植物来源的外泌体样纳米颗粒在物理性质和组成成分上类似于哺乳动物来源的外泌体, 具有抗肿瘤、抗氧化和抗炎等药理作用, 还可以作为药物递送载体, 在疾病治疗中展现出广泛的应用前景。通过检索中国知网和 Web of Science 等数据库, 对柑橘属植物来源的外泌体样纳米颗粒在制备、表征、稳定性、转运与分布、药理作用及药物载体应用的研究进展进行综述, 为柑橘属植物来源的外泌体样纳米颗粒进一步开发利用提供参考。

**关键词:** 柑橘属植物; 外泌体样纳米颗粒; 细胞外囊泡; 抗肿瘤; 抗氧化; 药物载体

**中图分类号:** R285 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2024)19-6768-11

**DOI:** 10.7501/j.issn.0253-2670.2024.19.029

## Research progress on *Citrus*-derived exosome-like nanoparticles and their application on treating diseases

HAN Fei<sup>1,4</sup>, MA Xiaomei<sup>1,4</sup>, SHI Xuli<sup>2,4</sup>, SUN Yanwen<sup>1,4</sup>, ZHOU Yan<sup>2,4</sup>, ZHANG Run<sup>1,4</sup>, QIU Feng<sup>2,3,4</sup>, DING Liqin<sup>1,3,4</sup>

1. Institute of Traditional Chinese Medicine, Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 301617, China
2. College of Traditional Chinese Medicine, Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 301617, China
3. Tianjin Key Laboratory of Therapeutic Substance of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 301617, China
4. State Key Laboratory of Chinese Medicine Modernization, Tianjin 301617, China

**Abstract:** Exosomes, small extracellular vesicles ranging in size from 30–150 nm and serve as key modulators of intercellular communication and play vital roles in the progression of numerous diseases. *Citrus*-derived exosome-like nanoparticles possess the same physical properties and compositional features as those of exosomes from mammalian cells, exhibit multiple pharmacological effects such as anti-tumor, antioxidant, and anti-inflammatory properties and are used as delivery carrier, which has a wide range of application prospects in the treatment of various diseases. By searching CNKI, Web of Science and other databases, the research progress of *Citrus*-derived exosome-like nanoparticles in preparation, characterization, stability, transportation and distribution, pharmacological actions along with drug delivery were reviewed, so as to provide reference for the further development and utilization of *Citrus*-derived exosome-like nanoparticles.

**Key words:** *Citrus* plant; exosome-like nanoparticles; extracellular vesicles; antitumor; antioxidant; drug delivery

外泌体是一种直径为 30~150 nm 的细胞外囊泡, 由大多数细胞分泌, 携带核酸、蛋白质、脂质等生物活性成分, 参与细胞间的信息传递, 在调节

癌症等疾病的发生发展中具有重要作用<sup>[1]</sup>。植物源性外泌体样纳米颗粒 (plant-derived exosome-like nanoparticles, PELNs) 来源于植物细胞, 其结构和

收稿日期: 2024-03-29

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (82030116); 天津市科技计划项目 (23ZYJDS00010)

作者简介: 韩菲 (1999—), 女, 硕士研究生, 研究方向为中药药效物质基础。E-mail: hfydncg@163.com

\*通信作者: 丁丽琴 (1983—), 女, 副研究员, 硕士生导师, 从事中药药效物质基础及中药体内代谢研究。E-mail: ruby70303@163.com

生物活性类似于哺乳动物来源的外泌体，具有来源广泛、免疫原性低、易于获取等优点。多项研究表明，PELNs具有抗炎、抗肿瘤、免疫调节等药理作用，可用于治疗肿瘤、炎症性疾病及细菌感染等疾病，还可作为药物靶向递送的载体，在疾病治疗领域展现出广阔的应用前景<sup>[2-3]</sup>。

目前报道的PELNs约有80种，其中约58%来源于可食用植物、28%来源于药用植物。柑橘属是可食用植物来源的外泌体样纳米颗粒(edible plant-derived exosome-like nanoparticles, EELNs)中研究最为广泛的属，占比达25%，包括葡萄柚、甜橙、酸橙、柠檬、橘子、柑橘、血橙及克里曼丁红橘8种植物，具有抗肿瘤、抗氧化、抗炎、调节肠道菌群、调血脂、抗病毒及促进伤口愈合等药理作用。此外，柑橘属植物来源的外泌体样纳米颗粒(citrus-derived exosome-like nanoparticles, CELNs)在EELNs药物载体研究中占比达54%(图1)，可作为新型药物载体，有效递送小分子化合物、核酸和蛋白质等多种物质。

本文依据PRISMA系统文献综述方法，在中国生物医学文献服务系统、中国知网、万方医药期刊数据库、维普中文科技期刊全文数据库、Web of Science、PubMed、Cochrane Library、EMbase及Wiley

Online Library等数据库中检索CELNs的相关文献，检索时间均从建库至2023年12月31日。以“柑橘属植物”AND(“细胞外囊泡”OR“纳米囊泡”OR“纳米载体”OR“外泌体”)为中文检索式，“citrus”AND(“extracellular vesicles”OR“nanovesicles”OR“nanovectors”OR“exosomes”)为英文检索式进行全文检索。根据纳入标准(发表在各数据库关于CELNs的研究文献；柑橘属植物的种类和数量不限；语言限制为中英文)和排除标准(非实证性文献；重复发表的文献；数据不完整或无法获取全文的文献；研究对象不符的文献)对文献进行筛选，最终纳入47篇有效文献。通过系统总结相关文献，对CELNs的制备、表征、稳定性、转运与分布、药理作用及药物载体应用方面进行整理、归纳，为CELNs的进一步开发利用提供依据，也为新型药物载体的研发提供参考。

### 1 CELNs的制备

目前，制备外泌体的技术手段主要有超速离心法、蔗糖密度梯度离心法及聚合物沉淀法等方法<sup>[4]</sup>(表1)。研究数据显示，超速离心法是制备CELNs的首选方法，其应用占CELNs制备方法的61%；其次是蔗糖密度梯度离心法和聚合物沉淀法，而电泳透析法应用则相对较少。

#### 1.1 超速离心法

超速离心法是外泌体制备的“金标准”，其利用样品中各成分在不同离心力作用下的沉降速率不同，实现制备外泌体的目的<sup>[5]</sup>。具体操作步骤为，在4℃条件下，依次进行(500~800)×g(20 min)、(2000~5000)×g(20~40 min)及(10000~16500)×g(20~180 min)的梯度离心，以去除死细胞、植物纤维、细胞碎片及微囊泡；最后经超高速(100000~150000)×g离心1~3 h，获得的沉淀即为CELNs(图2-A)。该法操作简单且成本较低；但由于需要多次离心操作并受到离心管体积的限制，该法耗时长且产量有限；CELNs易受核酸和蛋白质聚集体的污染，导致纯度较低<sup>[6]</sup>。因此，该方法适用于实验室

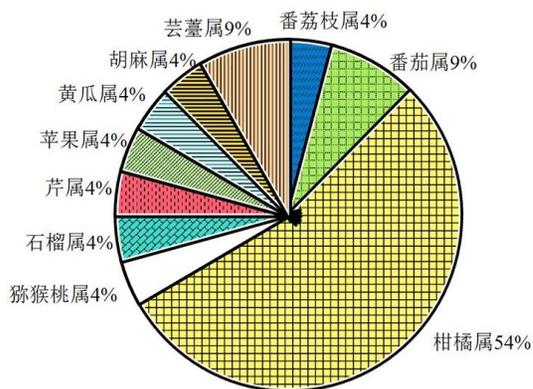


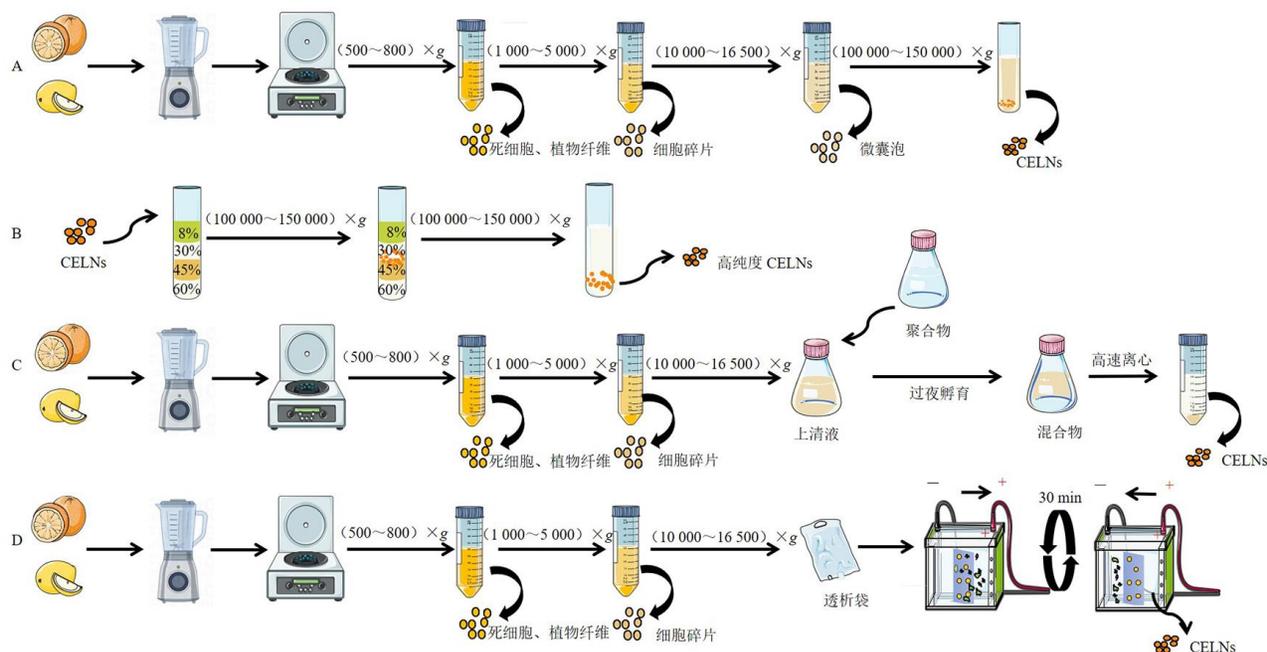
图1 EELNs中各属植物药物载体比例分布情况

Fig. 1 Publications proportion of drug delivery of each genus in EELNs

表1 CELNs不同制备方法优缺点及占比

Table 1 Advantages and disadvantages of different preparation methods of CELNs and their proportions

制备方法	占比/%	样本体积/mL	优点	缺点
超速离心法	61	<100	操作简单、成本较低、方法成熟	耗时长、产量有限、纯度较低
蔗糖密度梯度离心法	32	<30	纯度高	操作复杂、耗时长、产量有限
聚合物沉淀法	6	<250	操作简单、耗时短	纯度较低、回收率较低
电泳透析法	1	<250	经济有效、耗时短、纯度高	操作相对繁琐



A-超速离心法; B-蔗糖密度梯度离心法; C-聚合物沉淀法; D-电泳透析法。

A-ultracentrifugation; B-sucrose gradient ultracentrifugation; C-polyethylene glycol-based precipitation; D-electrophoretic technique with dialysis.

图 2 CELNs 制备方法流程图

Fig. 2 Flow chart of CELNs preparation

小规模研究和初步的 CELNs 制备实验。

## 1.2 蔗糖密度梯度离心法

蔗糖密度梯度离心法通过利用样品中各成分的密度差异,在离心过程中将其沉降到特定蔗糖密度层,从而有效地分离外泌体和杂质<sup>[6]</sup>。CELNs 主要分布在 30%~45%蔗糖密度层中<sup>[2,7]</sup>(图 2-B)。尽管该法在提高 CELNs 纯度方面具有明显优势,但由于其操作复杂、耗时长及产量有限等限制因素,更适用于小规模 CELNs 的生产和功能性研究<sup>[8]</sup>。

## 1.3 聚合物沉淀法

聚合物沉淀法利用共沉淀剂聚乙二醇,吸附外泌体周围的水分子,创造疏水环境,降低外泌体的溶解度,促使其聚集和沉淀。经高速离心处理后,即可实现制备外泌体的目的(图 2-C)<sup>[4]</sup>。该法操作简单、快速,适合大规模生产。然而由于聚乙二醇可以降低溶液中大部分颗粒的溶解度,导致一些杂质如蛋白质等也被沉淀,降低了外泌体纯度和回收率<sup>[4]</sup>。为了解决蛋白质共沉淀的问题,可以采用聚乙二醇和葡聚糖的两相分离系统方法,该法利用样品中各成分在聚乙二醇和葡聚糖溶液中的分配系数不同,在离心力作用下,选择性地将外泌体和蛋白质分配到葡聚糖和聚乙二醇溶液中,从而有效降低外泌体中蛋白质等杂质的含量,提高外泌体的纯度<sup>[9]</sup>。

## 1.4 电泳透析法

电泳透析法是一种利用外泌体与透析袋孔径的不同,结合电泳技术制备外泌体的方法<sup>[10]</sup>。在电场作用下,透析袋可以根据不同物质的直径大小,快速、选择性地使蛋白质等杂质通过,并有效地保留外泌体在透析袋内部(图 2-D)。该方法工艺相对简单,适用于预算有限的小规模实验室研究。虽然操作相对繁琐,需要定期更换电泳方向和电泳缓冲液,但仍可作为一种快速高效获取 CELNs 的方法。柑橘属植物中的成分复杂,性质各异,单一方法难以实现理想的分离效果,因此,常常将 2 种方法组合使用,如超速离心法与蔗糖密度梯度离心法结合、聚合物沉淀法与超速离心法结合等,以快速高效地制备纯度较高的 CELNs<sup>[2,11-12]</sup>。

## 2 CELNs 的表征

全面表征 CELNs 的结构和组成成分有助于揭示其功能机制,并确保其在实际应用中的可靠性和稳定性。常见的表征方法包括电子显微镜、动态光散射技术(dynamic light scattering, DLS)和纳米颗粒追踪技术(nanoparticle tracking analysis, NTA)等,用于测定 CELNs 的形态、粒径和 Zeta 电位。CELNs 含有脂质、蛋白质、核酸及小分子化合物等多种成分,可以采用十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝

胶电泳、液相色谱-质谱联用法、薄层色谱和高通量RNA测序等方法进行分析。

## 2.1 形态表征

CELNs 通常呈现近球形或茶杯状结构<sup>[10,13-19]</sup>, 常用电子显微镜进行表征, 如扫描电子显微镜 (scanning electron microscope, SEM)、透射电子显微镜 (transmission electron microscope, TEM) 和原子力显微镜 (atomic force microscope, AFM)。TEM 具有高分辨率, 可提供 CELNs 的详细形态学信息, 但需要在真空环境下操作, 并对样品进行复杂的处理和固定, 可能会破坏 CELNs 结构<sup>[20-21]</sup>。AFM 可以无损地捕获和检测 CELNs, 并清晰地展现 CELNs 的形态和结构, 但操作较为复杂, 对样品表面要求严格<sup>[22]</sup>。SEM 适用于观察 CELNs 表面形貌和三维结构, 但其分辨率低于 TEM<sup>[23]</sup>。

## 2.2 粒径和 Zeta 电位表征

外泌体的粒径和 Zeta 电位是影响其在细胞内摄取和药物输送等生物学功能的重要参数, 常用 DLS 和 NTA 进行表征。DLS 是主要的粒径和 Zeta 电位表征方法, 其应用占 CELNs 表征方法的 63%, 具有操作简单、快速的优点, 然而 DLS 在粒径分析中易受到大颗粒物质的影响, 因此在单一分散体系中的测量结果相对准确。NTA 也可用于测定 CELNs 的粒径大小, 其优势在于能够捕获并统计单个 CELNs 的运动轨迹, 减少大颗粒物质的干扰, 提高测量准确度并提供 CELNs 浓度数据, 适用于多相复杂体系<sup>[24]</sup>。CELNs 的主要粒径分布为 50~300 nm, Zeta 电位在近中性至-50 mV, 该物理特性有助于其抵抗聚集效应, 保持稳定性, 减少被清除的可能性, 从而延长在体内的循环时间。

## 2.3 组成成分分析

**2.3.1 脂质** 脂质是 CELNs 磷脂双分子层的主要组成成分, 其种类和含量与 CELNs 的生物学功能密切相关<sup>[25]</sup>, 常用质谱法和薄层色谱法等方法进行检测。CELNs 中含有多种脂质成分, 包括磷脂酰乙醇胺 (phosphatidyl ethanolamine, PE)、磷脂酰胆碱 (phosphatidylcholine, PC)、磷脂酰肌醇、磷脂酸、单半乳糖基二酰基甘油、二酰基甘油及少量的溶血磷脂等<sup>[2,13,26-27]</sup>。葡萄柚和甜橙来源的外泌体样纳米颗粒中主要的脂质成分均为 PE ( $\leq 45\%$ ) 和 PC ( $\leq 25\%$ )<sup>[2,13,26]</sup>。

**2.3.2 核酸** CELNs 含有微小 RNA (microRNA, miRNA) 和小 RNA (small RNA, sRNA) 等核酸分

子, 在柑橘属植物的生长发育和环境适应中具有关键作用。常用高通量 RNA 测序和生物信息学等方法进行鉴定表征<sup>[28]</sup>。Xiao 等<sup>[29]</sup>利用 Illumina HiSeq 2500 平台和生物信息学技术对葡萄柚、哈密瓜和甜橙等多种植物来源的外泌体样纳米颗粒进行分析, 发现这些纳米颗粒中含有大量的 miRNA, 进一步研究显示, csi-miRNA 在葡萄柚和橘子来源的外泌体样纳米颗粒中表达具有特异性。此外, Baldini 等<sup>[28]</sup>通过高通量 RNA 测序技术, 分析了柠檬和柠檬来源的外泌体样纳米颗粒 sRNA 表达谱, 结果显示柠檬汁中主要的 sRNA 长度为 8 和 29 bp, 而纳米颗粒中主要为 23 bp 的 sRNA。

**2.3.3 蛋白质** CELNs 中含有多种蛋白质, 主要包括酶 (如水解酶、氧化还原酶、裂解酶等)、调节糖脂代谢的蛋白质、与膜和囊泡相关的蛋白质 (如转运必需内体分选复合物)、热休克蛋白和泛素等, 在调节膜转运、囊泡运输、细胞生长和分裂等生物学过程中具有重要作用<sup>[30-31]</sup>。一般利用液相色谱-质谱联用技术和蛋白质组学等方法进行鉴定。Pocsfalvi 等<sup>[30]</sup>利用鸟枪法对葡萄柚、甜橙、酸橙和柠檬来源的外泌体样纳米颗粒中的蛋白质进行鉴定, 共发现约 1700 种蛋白质, 其中热休克蛋白、14-3-3、甘油醛-3-磷酸脱氢酶、果糖二磷酸醛缩酶 6、patellin-3-like 和网格蛋白均呈现高表达水平, 表明其可能在 CELNs 形成过程中发挥着重要作用。此外, Stanly 等<sup>[32]</sup>利用液相色谱-质谱联用技术结合蛋白质组学和生物信息学方法对克里曼丁红橘来源的外泌体样纳米颗粒中的蛋白质进行分析, 发现膜转运相关蛋白的表达量显著, 尤其是网格蛋白、patellin-3-like 呈现高水平表达, 提示其可能介导囊泡与环境之间物质的转运。

**2.3.4 小分子活性成分** CELNs 中含有多种同源植物的小分子活性成分, 如黄酮类和有机酸类等化合物, 在其生物学功能活性中具有关键作用。常采用液相色谱-质谱联用技术进行检测。在葡萄柚来源的外泌体样纳米颗粒中检测到具有抗炎活性的柚皮苷和柚皮素, 及柠檬酸、乙醇酸等有机酸类化合物<sup>[13,33]</sup>。柠檬来源的外泌体样纳米颗粒的主要活性成分为橙皮苷、柚皮苷、新橙皮苷、柠檬苦素和柠檬酸等<sup>[11,16,33-35]</sup>。橘子来源的外泌体样纳米颗粒含有大量的奎宁酸、柠檬酸、肉桂酸、柚皮苷和柠檬苦素等化合物<sup>[35]</sup>。

## 3 CELNs 的稳定性

维持外泌体的结构稳定性有助于保护其内容物

在细胞外环境中免受降解和失活的影响。研究结果显示, CELNs 在不同的环境条件下, 如 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、血浆及胃肠液中等, 均能保持良好的结构稳定性, 维持活性分子的完整性。

### 3.1 储存温度稳定性

CELNs 在低温条件下保存更为稳定, 可在 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 短期保存,  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 长期存储。在 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存条件下, 柑橘来源的外泌体样纳米颗粒的粒径逐渐增大, 可能是由于颗粒发生了聚集。而在 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 储存条件下, 其粒径和 Zeta 电位未观察到明显的变化<sup>[36-37]</sup>。

### 3.2 pH 稳定性

CELNs 在不同 pH 条件下的稳定性存在差异。相较于碱性溶液, 葡萄柚来源的外泌体样纳米颗粒在 $0.5\text{ mol/L HCl}$ 溶液中粒径分布更均一, 可能与蛋白质和脂质等物质之间的相互作用力增强有关<sup>[13]</sup>。而橙子来源的外泌体样纳米颗粒在酸性和碱性条件下, 粒径未发生明显变化<sup>[38]</sup>。

### 3.3 血浆稳定性

CELNs 在模拟血浆 (10%、50%胎牛血清) 中粒径几乎不变, 表明其在血浆中具有良好的稳定性。有研究借助体外模拟血浆对柠檬和葡萄柚来源的外泌体样纳米颗粒的稳定性进行分析, 结果发现其在 168 h 内粒径基本稳定, 长期保存 1 个月后仍能保持稳定<sup>[3,5,13,15]</sup>。

### 3.4 胃肠道稳定性

CELNs 具有良好的胃肠道稳定性, 可保护其内容物免受 pH 和消化酶的影响。如柠檬和甜橙来源的外泌体样纳米颗粒在胃肠道消化液中, 粒径无显著变化<sup>[11,16]</sup>。

### 3.5 裂解稳定性

在蛋白质裂解液中, CELNs 可以保持相对稳定。相较于磷酸盐缓冲液, 柠檬、葡萄柚和甜橙来源的外泌体样纳米颗粒在 $3\text{-}[(3\text{-胆酰胺丙基})\text{二甲氨基}]\text{丙磺酸内盐缓冲液}$ 中的数量和粒径大小未发生明显变化<sup>[39]</sup>。另外, 高温沸腾和超声波处理可破坏柠檬来源的外泌体样纳米颗粒结构, 使其稳定性下降<sup>[8]</sup>。

## 4 CELNs 的转运与分布

CELNs 可通过多种方式进入细胞, 如巨胞饮作用、网格蛋白和小窝蛋白介导的内吞作用等, 其多分布在胃肠道器官中。葡萄柚来源的外泌体样纳米颗粒经口服摄入后, 能够快速积聚在小肠、盲肠以及结肠远端, 并通过巨胞饮作用和网格蛋白介导的内吞作用进入肠道巨噬细胞和干细胞, 增加在肠道

内的吸收<sup>[13,40-41]</sup>。柠檬和橙子来源的外泌体样纳米颗粒也展现出与葡萄柚来源的外泌体样纳米颗粒相似的体内分布<sup>[7,10,38]</sup>。

此外, 给药途径能够影响 CELNs 的体内分布。经尾 iv 或 ip 后, CELNs 主要集中在肝脏、肺脏、肾脏和脾脏, 肌肉注射其多分布在肌肉中, 而鼻内给药其多位于肺脏和大脑中<sup>[2,42-44]</sup>。

## 5 CELNs 的药理作用

CELNs 具有广泛的药理作用, 包括抗肿瘤、抗氧化、抗炎、调节肠道菌群、调血脂、抗病毒及促进伤口愈合等 (图 3), 目前, 关于 CELNs 的抗肿瘤和抗氧化作用报道较多。

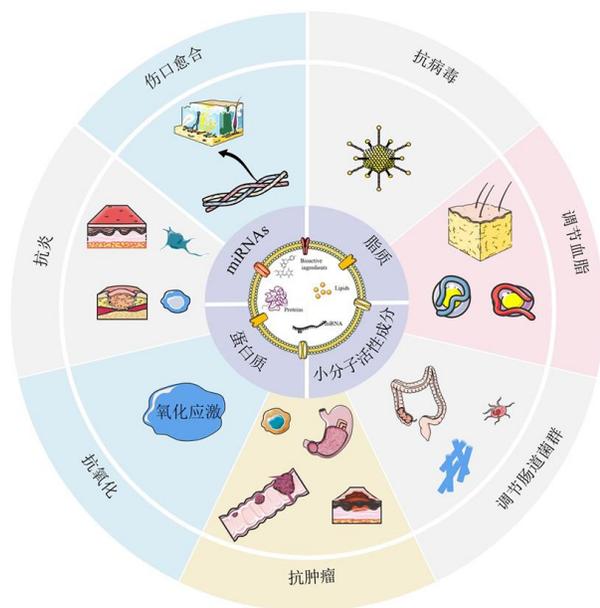


图 3 CELNs 药理作用

Fig. 3 Pharmacological activities of CELNs

### 5.1 抗肿瘤

CELNs 对结肠癌、白血病、胃癌及黑色素瘤均具有良好的抗肿瘤效果, 尤其是柠檬和葡萄柚来源的外泌体样纳米颗粒。

**5.1.1 抗结肠癌作用** CELNs 主要用于结肠癌疾病的治疗, 其应用占抗肿瘤研究的 50%。目前仅报道柠檬来源的外泌体样纳米颗粒对结肠癌具有一定的治疗效果。在结肠癌裸鼠皮下移植瘤模型中, 柠檬来源的外泌体样纳米颗粒通过降低乙酰辅酶 A 羧化酶  $\alpha$  (acetyl-CoA carboxylase  $\alpha$ , ACACA) 和磷脂酶含 DDHD 结构域 1 (DDHD domain containing 1, DDHD1) 的表达, 从而抑制脂质代谢, 发挥抗结肠癌作用<sup>[45-46]</sup>。体外实验表明, 柠檬来源的外泌体样纳米颗粒能够促进肿瘤坏死因子

相关凋亡诱导配体受体 (TNF-related apoptosis-inducing ligand, TRAIL)/死亡受体 5 (death receptor 5, DR5) 介导的信号转导<sup>[7]</sup>, 及通过巨胞饮作用途径, 抑制结肠癌细胞增殖, 促进结肠癌细胞凋亡, 有效降低结肠癌的发生率<sup>[16]</sup>。

**5.1.2 抗白血病作用** 柠檬和葡萄柚来源的外泌体样纳米颗粒均表现出治疗白血病的效果。柠檬来源的外泌体样纳米颗粒能够激活 TRAIL 受体, 启动凋亡信号通路, 诱导肿瘤细胞凋亡, 并抑制血管生成相关细胞因子的分泌, 有效抑制慢性髓系癌细胞的增殖<sup>[7]</sup>。此外, 葡萄柚来源的外泌体样纳米颗粒能够促进活性氧生成, 提高肿瘤细胞凋亡率, 抑制急性髓性癌细胞的生长, 其作用可能与抗坏血酸有关<sup>[23]</sup>。

**5.1.3 抗胃癌作用** 目前仅报道柠檬来源的外泌体样纳米颗粒具有抗胃癌效果, 其能够增加肿瘤细胞内活性氧浓度, 上调生长阻滞和 DNA 损伤基因 45 $\alpha$  (growth arrest and DNA damage 45 $\alpha$ , GADD45 $\alpha$ ) 的表达, 诱导胃癌细胞周期阻滞和凋亡, 有效抑制肿瘤细胞增殖, 发挥抗胃癌作用<sup>[10]</sup>。

**5.1.4 抗黑色素瘤作用** 葡萄柚来源的外泌体样纳米颗粒在黑色素瘤的发展和转移过程中发挥着重要作用, 其可通过调节细胞周期蛋白 B1 (cyclin B1, CCNB1)、CCNB2 及细胞周期蛋白依赖性激酶抑制因子 1 (cyclin-dependent kinase inhibitor 1, CDKN1) 的表达, 诱导黑色素瘤细胞周期阻滞, 有效抑制肿瘤细胞增殖<sup>[33]</sup>。

## 5.2 抗氧化

柠檬、葡萄柚、血橙和柑橘来源的外泌体样纳米颗粒均表现出显著的抗氧化能力。柠檬来源的外泌体样纳米颗粒能够激活芳香烃受体/核因子 E2 相关因子 2 (aryl hydrocarbon receptor/nuclear factor E2-related factor 2, AhR/Nrf2) 信号通路, 抑制氧化应激反应, 降低细胞内活性氧生成<sup>[39]</sup>, 其作用机制可能与抗坏血酸有关<sup>[28,47]</sup>。还能够显著抑制草酸钙诱导的肾小管细胞内质网应激反应, 延缓肾结石形成<sup>[48]</sup>。此外, 葡萄柚和血橙来源的外泌体样纳米颗粒能够显著降低细胞及线粒体内活性氧水平, 发挥抗氧化作用<sup>[39,49]</sup>。柑橘来源的外泌体样纳米颗粒抗氧化作用机制与其有效清除 1,1-二苯基-2-苦苯肼自由基和羟基自由基有关<sup>[37]</sup>。

## 5.3 抗炎

甜橙、葡萄柚、柠檬和柑橘来源的外泌体样纳

米颗粒均可以发挥抗炎作用。甜橙来源的外泌体样纳米颗粒能够穿透肠上皮细胞, 显著上调紧密连接蛋白如闭合蛋白、紧密连接蛋白 1 (claudin 1, CLDN1)、肌球蛋白轻链激酶的表达, 抑制白细胞介素-1 $\beta$  (interleukin-1 $\beta$ , IL-1 $\beta$ ) 等炎症因子的释放, 发挥抗炎作用<sup>[15,29]</sup>。葡萄柚来源的外泌体样纳米颗粒可通过调节血红素加氧酶-1 (heme oxygenase-1, HO-1) 表达, 抑制促炎因子生成, 有效抑制小鼠结肠炎症的发生<sup>[13]</sup>。此外, 柠檬来源的外泌体样纳米颗粒可调节细胞外调节蛋白激酶 1/2 (extracellular regulated protein kinases 1/2, ERK1/2) 和核因子- $\kappa$ B (nuclear factor- $\kappa$ B, NF- $\kappa$ B) 信号通路, 下调  $\gamma$  干扰素和肿瘤坏死因子- $\alpha$  (tumor necrosis factor- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ ) 等促炎因子的水平, 发挥抗炎作用<sup>[11]</sup>。柑橘来源的外泌体样纳米颗粒抗炎作用机制与其降低脂多糖诱导的炎症因子如 IL-6、TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  和 IL-10 的表达有关<sup>[37]</sup>。

## 5.4 调节肠道菌群

葡萄柚和柠檬来源的外泌体样纳米颗粒均表现出调节肠道菌群的潜力。葡萄柚来源的外泌体样纳米颗粒可被肠道细胞吸收<sup>[18]</sup>, 并被特定微生物群如瘤胃菌科及拟杆菌 S24-7 摄取<sup>[27]</sup>; 还可调控 Wnt/转录因子 4 (transcription factor 4, Tcf4) 信号通路维持肠道稳态<sup>[40]</sup>。此外, 柠檬来源的外泌体样纳米颗粒可调节转运核糖核酸 (transfer ribonucleic acid, tRNA) 如 tRNA<sub>ser</sub><sup>UCC</sup>、tRNA<sub>ser</sub><sup>UCG</sup> 表达, 抑制鼠李糖乳杆菌中主要分泌蛋白 1 (major secreted protein 1, Msp1) 和 Msp3 生成, 提高乳酸菌对胆汁的耐受性, 增加肠道乳酸菌的比例, 维持肠道健康<sup>[34]</sup>。

## 5.5 调血脂

橙子来源的外泌体样纳米颗粒可调控脂质吸收和乳糜微粒分泌的基因水平, 有效改善小鼠肠道和肝脏脂肪沉积<sup>[26]</sup>。Raimondo 等<sup>[50]</sup>研究证实柠檬来源的外泌体样纳米颗粒可抑制炎症因子的表达, 降低人体中低密度脂蛋白胆固醇 (low-density lipoprotein cholesterol, LDL-C) 的水平, 调节脂质代谢, 发挥调血脂作用。

## 5.6 抗病毒

葡萄柚来源的外泌体样纳米颗粒具有抗病毒感染的作用。Kalarikkal 等<sup>[51]</sup>研究发现葡萄柚来源的外泌体样纳米颗粒可被肺泡上皮细胞特异性摄取, 其内含有的生物活性成分 miRNA 包括 osa-miR-5077 和 gma-miR-166m, 能够特异性靶向严重急性

呼吸综合征冠状病毒 2 (severe acute respiratory syndrome coronavirus 2, SARS-COV-2) 基因, 抑制病毒复制, 发挥抗病毒作用。

### 5.7 促进伤口愈合

CELNs 也可促进慢性伤口愈合。葡萄柚来源的

外泌体样纳米颗粒可通过加快角质形成细胞的增殖和迁移速度, 抑制过量活性氧生成, 增加细胞外基质蛋白表达, 加速伤口愈合过程, 并且这种调节作用显示出一定的剂量相关性<sup>[17]</sup>。

CELNs 药理作用及机制见表 2。

表 2 CELNs 药理作用及机制

Table 2 Pharmacological activities and mechanisms of CELNs

植物来源	药理作用	研究对象	相关指标变化	文献
柠檬	抗结肠癌	人结肠癌 SW480 细胞	ACACA、ERK1/2、p38 MAPK↓	45
		SW480 细胞、SW480 裸鼠皮下移植瘤模型	MAPK/ERK、磷脂酰肌醇 3-激酶/蛋白激酶 B、DDHD1↓	46
		人结肠癌 HCT-15、SW480、HCT116 细胞	—	16
	抗白血病	人急变期慢性粒细胞白血病 LAMA84 细胞, LAMA84 裸鼠皮下移植瘤模型	TRAIL/DR5↑	7
		人急变期慢性粒细胞白血病 LAMA84 细胞, LAMA84 裸鼠皮下移植瘤模型	Bax、TRAIL/DR5 等↑; Survivin、VEGFA、IL-6、IL-8 等↓	7
	抗胃癌	人胃癌 AGS、BGC-823、SGC-7901 细胞, SGC-7901 裸鼠皮下移植瘤模型	GADD45α、活性氧↑; Caspase-3↓	10
	抗氧化	人真皮成纤维 HDF-α 细胞、斑马鱼模型	AhR/Nrf2、COL1α1、HAS2↑; 活性氧↓	47
		—	—	39
		人间充质干细胞	活性氧↓	28
		乙二醇诱导的大鼠草酸钙肾结石模型	—	48
抗炎	小鼠 RAW264.7 巨噬细胞、人外周血单核细胞	IL-9、IL-10↑; TNF-α、γ 干扰素、NF-κB/ERK1/2↓	11	
调节肠道菌群	—	tRNA <sub>ser</sub> <sup>UCC</sup> 、tRNA <sub>ser</sub> <sup>UCG</sup> ↑; Msp1、Msp3↓	34	
调血脂	健康受试者	LDL-C、HDL-C、总胆固醇、LDL/HDL↓	50	
葡萄柚	抗白血病	人淋巴瘤 U937 细胞、人慢性髓系白血病 K562 细胞	活性氧↑	23
	抗黑色素瘤	人永生角质形成 HaCaT 细胞、人恶性黑色素瘤 A375 细胞	CDKN1↑; CCNB1、CCNB2↓	33
	抗氧化	—	—	39,49
	抗炎	DSS 诱导的小鼠溃疡性结肠炎模型	E-cadherin、HO-1、IL-10↑; IL-6、IL-1β、TNF-α、MCP-1、CXCL9、CXCL10↓	13
	调节肠道菌群	大鼠小肠隐窝上皮 IEC6 细胞、正常小鼠/Lgr5-EGFP-IRES-CreERT2 杂合小鼠模型(基因敲除)	Wnt/Tcf4↑	18,27,40
抗病毒	—	—	51	
伤口愈合	HaCaT 细胞、人脐静脉血内皮细胞	COL1A1、纤连蛋白、波形蛋白、层黏连蛋白、EGF、IGF-1↑; TIMP-1、活性氧↓	17	
甜橙	抗炎	人结肠癌上皮 Caco2 细胞	CLDN1、闭合蛋白↑; ICAM-1、HO-1、IL-1β↓	15,29
	调血脂	高脂高糖高能量饮食诱导的肥胖小鼠模型	Toll 样受体 4、DGAT1↑; MTP、总胆固醇等↓	26
柑橘	抗炎	RAW264.7 细胞	IL-10↑; TNF-α、IL-6、IL-1β↓	37
	抗氧化	—	—	37
血橙	抗氧化	—	—	39

MAPK-丝裂原活化蛋白激酶; Bax-B 淋巴瘤-2 相关 X 蛋白质; VEGFA-血管内皮生长因子 A; Caspase-3-半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-3; COL1α1-I 型胶原蛋白 α1; HAS2-透明质酸酶 2; HDL-C-高密度脂蛋白胆固醇; MCP-1-单核细胞趋化蛋白-1; CXCL9-CXC 趋化因子配体 9; EGF-表皮生长因子; IGF-1-胰岛素样生长因子-1; TIMP-1-基质金属蛋白酶抑制剂-1; ICAM-1-细胞间黏附分子-1; DGAT1-二酰甘油酰基转移酶 1; MTP-微粒体甘油三酯转移蛋白; DSS-葡聚糖硫酸钠; “↑”表示上升; “↓”表示下降。

MAPK-mitogen-activated protein kinase; Bax-B-cell lymphoma-2 associated X protein; VEGFA-vascular endothelial growth factor A; Caspase-3-cysteine specific proteinase-3; COL1α1-collagen type I α1; HAS2-hyaluronate synthase 2; HDL-C-high density lipoprotein cholesterol; MCP-1-monocyte chemoattractant protein-1; CXCL9-CXC motif chemokine ligand 9; EGF-epidermal growth factor; IGF-1-insulin like growth factor-1; TIMP-1-tissue inhibitor of metalloproteinase-1; ICAM-1-intercellular cell adhesion molecule-1; DGAT1-diacylglycerol acyltransferase 1; MTP-microsomal triglyceride transfer protein; DSS-dextran sulfate sodium salt; “↑” represents increase; “↓” represents decrease.

## 6 CELNs 作为药物载体

在 47 篇有效文献中, 有 22 篇研究文献与 CELNs 的药物载体功能相关, 可用于递送小分子药物、核酸和蛋白质等物质, 其中以递送小分子药物居多。

### 6.1 小分子药物

CELNs 广泛应用于递送多种小分子药物, 包括紫杉醇、阿霉素、JSI-124、CX5461、甲氨蝶呤、姜黄素、橘皮素、硫代硫酸钠、地塞米松磷酸钠等。葡萄柚来源的外泌体样纳米颗粒是常用的小分子药物递送载体, 其应用占 CELNs 小分子药物载体研究的 64%。葡萄柚来源的外泌体样纳米颗粒可有效地将阿霉素、紫杉醇、JSI-124 和 CX5461 输送至肿瘤组织, 增强对肿瘤细胞的杀伤效果, 并且选择性地作用于受体细胞, 减少对非肿瘤细胞的不良反应<sup>[2,12,42,49,52-53]</sup>。也可靶向输送甲氨蝶呤和姜黄素至炎症部位, 提高肠道炎症细胞内药物浓度, 显著抑制炎症刺激反应, 增强抗溃疡性结肠炎疗效<sup>[13,53]</sup>。此外, 葡萄柚来源的外泌体样纳米颗粒还可将硫代硫酸钠输送至血管钙化部位, 促进 M<sub>2</sub> 型巨噬细胞的极化, 减少炎症反应, 增强对血管钙化的治疗作用<sup>[54]</sup>。甜橙、柠檬和柑橘来源的外泌体样纳米颗粒也被用作小分子药物递送载体。甜橙来源的外泌体样纳米颗粒能够增强阿霉素内化到卵巢癌细胞的能力, 触发转胞吞作用, 显著抑制卵巢癌细胞的生长, 并且没有观察到明显的不良反应<sup>[36]</sup>; 还可用作姜黄素、地塞米松磷酸钠的药物递送载体, 增强药物治疗效果<sup>[38,55]</sup>。柠檬来源的外泌体样纳米颗粒能够有效地装载阿霉素, 并被靶细胞高效摄取, 有效耗散细胞内能量, 减少三磷酸腺苷的生成, 克服癌症多药耐药性<sup>[14]</sup>。柑橘来源的外泌体样纳米颗粒装载橘皮素后展现出比游离药物更强的抗炎活性<sup>[37]</sup>。

### 6.2 核酸药物

CELNs 可被用于递送多种核酸药物, 包括 mRNA、miRNA 和 siRNA 等。葡萄柚、橘子和甜橙来源的外泌体样纳米颗粒均可作为核酸药物的递送载体。葡萄柚来源的外泌体样纳米颗粒是应用最多的核酸药物载体, 可携带 miRNA-17 穿透血脑屏障, 抵达脑肿瘤部位, 提高胶质瘤细胞内药物浓度, 显著抑制胶质瘤细胞增殖, 减缓肿瘤的生长速度<sup>[56]</sup>; 递送 miRNA-18a 以激活 M<sub>1</sub> 型巨噬细胞, 抑制结肠癌向肝脏的转移<sup>[57]</sup>; 还可提高

siRNA 稳定性及转染效率, 抑制荧光素酶基因的表达, 显著降低荧光素酶活性<sup>[2]</sup>及靶向递送 P-糖蛋白 siRNA 至肿瘤细胞, 有效克服结肠癌耐药性<sup>[43]</sup>。甜橙来源的外泌体样纳米颗粒能够作为 SARS-COV-2 的 mRNA 疫苗载体, 保护疫苗免受降解应激, 有效将其输送至目标细胞, 引发体液免疫反应<sup>[58]</sup>。经过冻干处理后, 仍能实现最佳黏膜吸收, 并触发免疫反应<sup>[59]</sup>。橘子来源的外泌体样纳米颗粒能够提高磷脂酶 DDHD1 siRNA 内化到 SW480 细胞的能力, 促使其在癌细胞内积累, 显著抑制磷脂酶 DDHD1 基因表达<sup>[35]</sup>。

### 6.3 蛋白质药物

除用于装载小分子药物和核酸药物外, CELNs 还可递送蛋白质分子。葡萄柚来源的外泌体样纳米颗粒可将热休克蛋白 70 (heat shock 70, HSP70) 递送至肿瘤细胞, 并提高 HSP70 内化至靶细胞的能力, 增加肿瘤细胞对化疗药物敏感性, 显著抑制胶质瘤及结肠癌细胞的增殖, 安全有效地发挥抗肿瘤作用<sup>[19,44]</sup>。CELNs 作为药物载体的应用见表 3。

## 7 结语

CELNs 是由柑橘属植物细胞分泌的细胞外囊泡, 其结构和功能与哺乳动物来源的外泌体类似, 主要由脂质、核酸、蛋白质和小分子活性成分等物质组成, 具有安全、稳定、低免疫原性的优势。CELNs 不仅具有抗肿瘤、抗氧化、抗炎等药理作用, 可有效防治肿瘤、炎症性疾病、皮肤损伤和病毒性感染等疾病; 亦可作为药物递送的载体, 递送小分子、核酸、蛋白质等药物。相较于哺乳动物来源的外泌体, CELNs 的研究起步较晚, 目前仍处于基础研究阶段, 面临着多项挑战。(1) 目前, CELNs 的制备仍停留在实验室阶段, 效率较低, 难以实现大规模制备, 限制了其生产和应用的可扩展性, 开发可大规模制备、稳定且可控的 CELNs 方法是解决其应用问题的关键技术, 并以期将其应用于其他 PELNs 的制备。(2) CELNs 的表征主要通过形态、粒径、Zeta 电位及内容物进行确定, 关于其标志性物质尚未统一, 有待寻找其质量标志物。(3) CELNs 的药理作用研究主要集中在抗肿瘤、抗氧化、抗炎等方面, 是否还具有其他药理作用尚未可知, 及其作用机制还有待进一步明确。(4) 目前关于 CELNs 装载小分子药物、核酸和蛋白质方面已有不少报道, 但其是否可装载所有类型的小分子药物、核酸

表 3 CELNs 作为药物载体的应用  
Table 3 Application of CELNs as drug carriers

植物来源	药物	细胞系/动物模型	治疗疾病	文献
葡萄柚	JSI-124	人 GL-26 脑胶质瘤裸鼠原位移植瘤模型	胶质瘤	2
	紫杉醇、siRNA	人 CT26、SW620 结肠癌裸鼠皮下移植瘤模型	结肠癌	2
	阿霉素	人 LN229-luc 脑胶质瘤裸鼠原位移植瘤模型	胶质瘤	12
	CX5461	咪喹莫特诱导的小鼠银屑病模型/2,4-二硝基氯苯诱导的小鼠 特应性皮炎模型	自身免疫性疾病	49
	阿霉素、紫杉醇	小鼠乳腺癌 4T1 细胞实验性肺转移模型/小鼠黑色素瘤 B16F10 实验性肺转移模型	乳腺癌和黑色素瘤	42
	阿霉素	人 MDA-MB-453 乳腺癌裸鼠原位移植瘤模型	乳腺癌	52
	阿霉素、姜黄素	小鼠 CT26 结肠癌裸鼠皮下移植瘤模型/小鼠乳腺癌 4T1 细胞 实验性肺转移模型/DSS 诱导的小鼠溃疡性结肠炎模型	乳腺癌、结肠癌和溃 疡性结肠炎	53
	甲氨蝶呤	DSS 诱导的小鼠溃疡性结肠炎模型	溃疡性结肠炎	13
	硫代硫酸钠	血管钙化小鼠模型	血管钙化	54
	miRNA-17	小鼠 GL-26 脑胶质瘤裸鼠原位移植瘤模型	胶质瘤	56
	miRNA-18a	小鼠 CT26 结肠癌裸鼠皮下移植瘤模型	结肠癌肝转移	57
	SiRNA	HaCaT 细胞	—	41
	HSP70	小鼠 Gl-Tr 脑胶质瘤裸鼠原位移植瘤模型	胶质瘤	19
	HSP70	HCT116 细胞、人结肠癌 DLD1 细胞	结肠癌	44
阿霉素	人结肠癌 LoVo/MDR 裸鼠皮下移植瘤模型	结肠癌耐药性	43	
甜橙	阿霉素	人卵巢癌 SKOV3-Luc 裸鼠原位移植瘤模型	卵巢癌	36
	地塞米松磷酸钠	免疫球蛋白 A 肾病小鼠模型	免疫球蛋白 A 肾病	38
	姜黄素	—	—	55
	SARS-CoV-2 mRNA	—	冠状病毒感染	58-59
柠檬	阿霉素、紫杉醇	SKOV3-Luc 裸鼠原位移植瘤模型	卵巢癌	14
橘子	siRNA	SW480 细胞	结肠癌	35
柑橘	橘皮素	RAW264.7 细胞	—	37

和蛋白质等仍未可知。此外，装载药物后的 CELNs 能否靶向到病变部位仍有待深入探究。

**利益冲突** 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

[1] Kalluri R, LeBleu V S. The biology, function, and biomedical applications of exosomes [J]. *Science*, 2020, 367(6478): eaau6977.

[2] 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.

[3] 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.

[4] 赵清, 王通, 赵可伟. 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.

[5] Dad H A, Gu T W, Zhu A Q, et al. Plant exosome-like nanovesicles: Emerging therapeutics and drug delivery

nanoplatfoms [J]. *Mol Ther*, 2021, 29(1): 13-31.

[6] Wang J, Chen D, Ho E A. Challenges in the development and establishment of exosome-based drug delivery systems [J]. *J Control Release*, 2021, 329: 894-906.

[7] 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.

[8] Chen B Y, Sung C W H, Chen C, et al. Advances in exosomes technology [J]. *Clin Chim Acta*, 2019, 493: 14-19.

[9] Kırbaş O K, Bozkurt B T, Asutay A B, et al. Optimized isolation of extracellular vesicles from various organic sources using aqueous two-phase system [J]. *Sci Rep*, 2019, 9(1): 19159.

[10] 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 Nanobiotechnology*, 2020, 18(1): 100.

- [11] Raimondo S, Urzi O, Meraviglia S, *et al.* Anti-inflammatory properties of lemon-derived extracellular vesicles are achieved through the inhibition of ERK/NF- $\kappa$ B signalling pathways [J]. *J Cell Mol Med*, 2022, 26(15): 4195-4209.
- [12] 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.
- [13] 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.
- [14] Xiao Q, Zhao W, Wu C T, *et al.* Lemon-derived extracellular vesicles nanodrugs enable to efficiently overcome cancer multidrug resistance by endocytosis-triggered energy dissipation and energy production reduction [J]. *Adv Sci*, 2022, 9(20): e2105274.
- [15] Bruno S P, Paolini A, D'Oria V, *et al.* Extracellular vesicles derived from *Citrus sinensis* modulate inflammatory genes and tight junctions in a human model of intestinal epithelium [J]. *Front Nutr*, 2021, 8: 778998.
- [16] Takakura H, Nakao T, Narita T, *et al.* *Citrus limon* L.-derived nanovesicles show an inhibitory effect on cell growth in p53-inactivated colorectal cancer cells via the macropinocytosis pathway [J]. *Biomedicines*, 2022, 10(6): 1352.
- [17] Savcı Y, Kırbaş O K, Bozkurt B T, *et al.* Grapefruit-derived extracellular vesicles as a promising cell-free therapeutic tool for wound healing [J]. *Food Funct*, 2021, 12(11): 5144-5156.
- [18] Ito Y, Taniguchi K, Kuranaga Y, *et al.* Uptake of microRNAs from exosome-like nanovesicles of edible plant juice by rat enterocytes [J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(7): 3749.
- [19] Kilasoniya A, Garaeva L, Shtam T, *et al.* Potential of plant exosome vesicles from grapefruit (*Citrus × paradisi*) and tomato (*Solanum lycopersicum*) juices as functional ingredients and targeted drug delivery vehicles [J]. *Antioxidants*, 2023, 12(4): 943.
- [20] Pascucci L, Scattini G. Imaging extracellular vesicles by transmission electron microscopy: Coping with technical hurdles and morphological interpretation [J]. *Biochim Biophys Acta Gen Subj*, 2021, 1865(4): 129648.
- [21] Gupta P, Rai N, Verma A, *et al.* Microscopy based methods for characterization, drug delivery, and understanding the dynamics of nanoparticles [J]. *Med Res Rev*, 2024, 44(1): 138-168.
- [22] Liu Q, Fu Y H, Qin Z H, *et al.* Progress in the applications of atomic force microscope (AFM) for mineralogical research [J]. *Micron*, 2023, 170: 103460.
- [23] Castelli G, Logozzi M, Mizzone D, *et al.* Ex vivo anti-leukemic effect of exosome-like grapefruit-derived nanovesicles from organic farming-the potential role of ascorbic acid [J]. *Int J Mol Sci*, 2023, 24(21): 15663.
- [24] 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.
- [25] Ambrosone A, Barbulova A, Cappetta E, *et al.* Plant extracellular vesicles: Current landscape and future directions [J]. *Plants*, 2023, 12(24): 4141.
- [26] Berger E, Colosetti P, Jalabert A, *et al.* Use of nanovesicles from orange juice to reverse diet-induced gut modifications in diet-induced obese mice [J]. *Mol Ther Methods Clin Dev*, 2020, 18: 880-892.
- [27] 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.
- [28] Baldini N, Torreggiani E, Roncuzzi L, *et al.* Exosome-like nanovesicles isolated from *Citrus limon* L. exert antioxidative effect [J]. *Curr Pharm Biotechnol*, 2018, 19(11): 877-885.
- [29] Xiao J, Feng S Y, Wang X, *et al.* Identification of exosome-like nanoparticle-derived microRNAs from 11 edible fruits and vegetables [J]. *PeerJ*, 2018, 6: e5186.
- [30] Pocsfalvi G, Turiák L, Ambrosone A, *et al.* Protein biocargo of citrus fruit-derived vesicles reveals heterogeneous transport and extracellular vesicle populations [J]. *J Plant Physiol*, 2018, 229: 111-121.
- [31] Pocsfalvi G, Turiák L, Ambrosone A, *et al.* Physicochemical and protein datasets related to citrus juice sac cells-derived nanovesicles and microvesicles [J]. *Data Brief*, 2018, 22: 251-254.
- [32] Stanly C, Moubarak M, Fiume I, *et al.* Membrane transporters in *Citrus clementina* fruit juice-derived nanovesicles [J]. *Int J Mol Sci*, 2019, 20(24): 6205.
- [33] Stanly C, Alfieri M, Ambrosone A, *et al.* Grapefruit-derived micro and nanovesicles show distinct metabolome profiles and anticancer activities in the A375 human melanoma cell line [J]. *Cells*, 2020, 9(12): 2722.
- [34] Lei C, Teng Y, He L Q, *et al.* Lemon exosome-like nanoparticles enhance stress survival of gut bacteria by RNase P-mediated specific tRNA decay [J]. *iScience*, 2021, 24(6): 102511.
- [35] Rabienezhad Ganji N, Urzi O, Tinnirello V, *et al.* Proof-of-concept study on the use of tangerine-derived nanovesicles as siRNA delivery vehicles toward colorectal cancer cell line SW480 [J]. *Int J Mol Sci*, 2023, 25(1): 546.
- [36] Long F, Pan Y, Li J H, *et al.* Orange-derived extracellular vesicles nanodrugs for efficient treatment of ovarian

- cancer assisted by transcytosis effect [J]. *Acta Pharm Sin B*, 2023, 13(12): 5121-5134.
- [37] Li S J, Ye Z M, Zhao L T, *et al.* Evaluation of antioxidant activity and drug delivery potential of cell-derived extracellular vesicles from *Citrus reticulata* blanco cv. 'dahongpao' [J]. *Antioxidants*, 2023, 12(9): 1706.
- [38] Zhang W, Yuan Y, Li X, *et al.* Orange-derived and dexamethasone-encapsulated extracellular vesicles reduced proteinuria and alleviated pathological lesions in IgA nephropathy by targeting intestinal lymphocytes [J]. *Front Immunol*, 2022, 13: 900963.
- [39] Logozzi M, Di Raimo R, Mizzone D, *et al.* Nanovesicles from organic agriculture-derived fruits and vegetables: Characterization and functional antioxidant content [J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(15): 8170.
- [40] Mu J Y, Zhuang X Y, Wang Q L, *et al.* Interspecies communication between plant and mouse gut host cells through edible plant derived exosome-like nanoparticles [J]. *Mol Nutr Food Res*, 2014, 58(7): 1561-1573.
- [41] Itakura S, Shohji A, Amagai S, *et al.* Gene knockdown in HaCaT cells by small interfering RNAs entrapped in grapefruit-derived extracellular vesicles using a microfluidic device [J]. *Sci Rep*, 2023, 13(1): 3102.
- [42] Wang Q L, Zhuang X Y, Sriwastva M K, *et al.* Blood exosomes regulate the tissue distribution of grapefruit-derived nanovector via CD36 and IGF1R pathways [J]. *Theranostics*, 2018, 8(18): 4912-4924.
- [43] Yan W, Tao M Y, Jiang B F, *et al.* Overcoming drug resistance in colon cancer by aptamer-mediated targeted co-delivery of drug and siRNA using grapefruit-derived nanovectors [J]. *Cell Physiol Biochem*, 2018, 50(1): 79-91.
- [44] Garaeva L, Kamyshinsky R, Kil Y, *et al.* Delivery of functional exogenous proteins by plant-derived vesicles to human cells *in vitro* [J]. *Sci Rep*, 2021, 11(1): 6489.
- [45] Raimondo S, Saieva L, Cristaldi M, *et al.* Label-free quantitative proteomic profiling of colon cancer cells identifies acetyl-CoA carboxylase alpha as antitumor target of *Citrus limon*-derived nanovesicles [J]. *J Proteomics*, 2018, 173: 1-11.
- [46] Raimondo S, Cristaldi M, Fontana S, *et al.* The phospholipase DDHD1 as a new target in colorectal cancer therapy [J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2018, 37(1): 82.
- [47] Urzi O, Cafora M, Ganji N R, *et al.* Lemon-derived nanovesicles achieve antioxidant and anti-inflammatory effects activating the AhR/Nrf2 signaling pathway [J]. *iScience*, 2023, 26(7): 107041.
- [48] Zhang L, Li S M, Cong M H, *et al.* Lemon-derived extracellular vesicle-like nanoparticles block the progression of kidney stones by antagonizing endoplasmic reticulum stress in renal tubular cells [J]. *Nano Lett*, 2023, 23(4): 1555-1563.
- [49] Huang R F, Jia B, Su D D, *et al.* Plant exosomes fused with engineered mesenchymal stem cell-derived nanovesicles for synergistic therapy of autoimmune skin disorders [J]. *J Extracell Vesicles*, 2023, 12(10): e12361.
- [50] Raimondo S, Nikolic D, Conigliaro A, *et al.* Preliminary results of CitraVes™ effects on low density lipoprotein cholesterol and waist circumference in healthy subjects after 12 weeks: A pilot open-label study [J]. *Metabolites*, 2021, 11(5): 276.
- [51] Kalarikkal S P, Sundaram G M. Edible plant-derived exosomal microRNAs: Exploiting a cross-Kingdom regulatory mechanism for targeting SARS-CoV-2 [J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2021, 414: 115425.
- [52] Tang Z, Jun Y L, Lv Y G, *et al.* Aptamer-conjugated and doxorubicin-loaded grapefruit-derived nanovectors for targeted therapy against HER2<sup>+</sup> breast cancer [J]. *J Drug Target*, 2020, 28(2): 186-194.
- [53] Wang Q L, Ren Y, Mu J Y, *et al.* Grapefruit-derived nanovectors use an activated leukocyte trafficking pathway to deliver therapeutic agents to inflammatory tumor sites [J]. *Cancer Res*, 2015, 75(12): 2520-2529.
- [54] Feng W J, Teng Y T, Zhong Q P, *et al.* Biomimetic grapefruit-derived extracellular vesicles for safe and targeted delivery of sodium thiosulfate against vascular calcification [J]. *ACS Nano*, 2023, 17(24): 24773-24789.
- [55] Liu H, Song J W, Zhou L, *et al.* Construction of curcumin-fortified juices using their self-derived extracellular vesicles as natural delivery systems: Grape, tomato, and orange juices [J]. *Food Funct*, 2023, 14(20): 9364-9376.
- [56] Zhuang X Y, Teng Y, Samykutty A, *et al.* Grapefruit-derived nanovectors delivering therapeutic miR17 through an intranasal route inhibit brain tumor progression [J]. *Mol Ther*, 2016, 24(1): 96-105.
- [57] Teng Y, Mu J Y, Hu X, *et al.* Grapefruit-derived nanovectors deliver miR-18a for treatment of liver metastasis of colon cancer by induction of M1 macrophages [J]. *Oncotarget*, 2016, 7(18): 25683-25697.
- [58] Pomatto M A C, Gai C, Negro F, *et al.* Plant-derived extracellular vesicles as a delivery platform for RNA-based vaccine: Feasibility study of an oral and intranasal SARS-CoV-2 vaccine [J]. *Pharmaceutics*, 2023, 15(3): 974.
- [59] Pomatto M, Gai C, Negro F, *et al.* Oral delivery of mRNA vaccine by plant-derived extracellular vesicle carriers [J]. *Cells*, 2023, 12(14): 1826-1841.