

浸泡与水煎 2 种预处理方式所得黄芪囊泡样纳米颗粒表征及 miRNA 组成和靶基因富集通路的对比研究

杨万彭¹, 许思楠¹, 董孟炜¹, 李文芳¹, 巴 特^{2,3}, 刘 杨^{1,2,3*}, 傅松涛^{2*}

1. 山西中医药大学基础医学院, 山西 晋中 030619

2. 山西中医药大学 中西医结合基础实验室, 山西 晋中 030619

3. 山西中医药大学 山西省中医药交叉创新工程研究中心, 山西 晋中 030619

摘 要: 目的 探究浸泡与水煎 2 种预处理方式所得黄芪来源囊泡样纳米颗粒 (*Astragali Radix*-derived extracellular vesicles-like particles, AR-EVLP) 在表征、miRNA 组成和靶基因富集通路上的差异。方法 通过透射电子显微镜、纳米颗粒跟踪分析仪、纳米激光粒度仪、蛋白浓度定量、银染、实时荧光定量 PCR、miRNA 测序及生物信息学分析, 对比分析 2 种预处理所得 AR-EVLP 的形态、颗粒浓度、粒径大小、 ζ 电位、蛋白浓度、蛋白分布等表征差异及 miRNA 组成和分子功能差异。结果 浸泡预处理所得 AR-EVLP 质量优于水煎预处理; 水煎预处理所得 AR-EVLP 的产率较高、粒径相对较大、 ζ 电位绝对值相对较小、蛋白浓度更高且分布更为集中。测序结果显示, 2 种预处理方式所得 AR-EVLP 有 219 个差异性表达 miRNA。基因本体论 (gene ontology, GO) 分析显示, 2 种预处理所得 AR-EVLP 的 miRNA 靶基因均在蛋白结合条目显著富集, 提示其跨物种调控的潜能。京都基因与基因组百科全书 (Kyoto encyclopedia of genes and genomes, KEGG) 富集分析显示, 浸泡预处理所得 AR-EVLP 的 miRNA 中 lja-miR1511-3p_R-3_1ss2AC 和 gma-miR1511_R+1_1ss2AC, 可能通过甘油磷脂代谢通路在脂肪肝、神经系统退行性疾病具有治疗潜能; 水煎预处理所得 AR-EVLP 的 miRNA 中 mtr-miR164a、stu-miR477a-5p_R+1_1ss21CG、gma-MIR162c-p5 可能通过胶质瘤、前列腺癌、p53 信号通路、Hedgehog 信号通路、ErbB 信号通路、丝裂原活化蛋白激酶 (mitogen-activated protein kinase, MAPK) 信号通路等通路治疗癌症相关疾病。结论 不同预处理所得 AR-EVLP 在表征、蛋白成分、miRNA 表达谱及其生物学功能导向存在显著差异。浸泡预处理所得 AR-EVLP 质量较好, 倾向于脂肪肝、神经系统退行性疾病等疾病治疗, 水煎预处理所得 AR-EVLP 的产率较高, 倾向于癌症相关疾病治疗。

关键词: 黄芪; 囊泡样纳米颗粒; 提取技术; miRNA; 生物信息学分析

中图分类号: R283.6 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2026)14-5523-14

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2026.14.015

Comparative study on characterization, miRNA composition, and target gene enrichment pathways of *Astragali Radix*-derived extracellular vesicles-like particles obtained by soaking and water decoction pretreatment methods

YANG Wanpeng¹, XU Sinan¹, DONG Mengwei¹, LI Wenfang¹, BA Te^{2,3}, LIU Yang^{1,2,3}, FU Songtao²

1. School of Basic Medical Sciences, Shanxi University of Traditional Chinese Medicine, Jinzhong 030619, China

2. Integrated Traditional Chinese and Western Medicine Basic Laboratory, Shanxi University of Traditional Chinese Medicine, Jinzhong 030619, China

3. Shanxi Province Traditional Chinese Medicine Cross-Disciplinary Innovation Engineering Research Center, Shanxi University of Traditional Chinese Medicine, Jinzhong 030619, China

Abstract: Objective To explore the differences in characterization, miRNA composition, and target gene enrichment pathways of *Astragali Radix*-derived extracellular vesicle-like particles (AR-EVLP) obtained through two pretreatment methods: soaking and

收稿日期: 2026-02-26

基金项目: 医学救援关键技术装备应急管理部重点实验室开放基金 (YJBKFKT202516); 山西中医药大学科技创新能力培育计划 (025PY-CXY-007); 经方扶阳山西省重点实验室开放课题研究基金项目 (CPSY202503); 风湿免疫病中西医结合基础科学研究学科建设项目 (2026XK29)

作者简介: 杨万彭, 硕士研究生, 研究方向为中西医结合基础研究。E-mail: 2593645743@qq.com

***通信作者:** 傅松涛, 教授, 从事中西医结合基础研究。E-mail: fst7789@sina.com

刘 杨, 教授, 从事中西医结合基础研究。E-mail: liuyang1980@sxtcm.edu.cn

decoction. **Methods** Transmission electron microscopy, nanoparticle tracking analysis, nanoscale laser particle sizing, protein quantification, silver staining, real-time quantitative PCR, miRNA sequencing, and bioinformatics analysis were used to compare the morphology, particle concentration, size, ζ potential, protein concentration, protein distribution, miRNA composition, and molecular function differences of AR-EVLP obtained from the two pretreatment methods. **Results** The quality of AR-EVLP obtained from soaking was better than that obtained from decoction; AR-EVLP from decoction had a higher yield, relatively larger particle size, smaller absolute ζ potential, higher protein concentration, and more concentrated protein distribution. Sequencing results showed 219 differentially expressed miRNAs between the AR-EVLP obtained by the two pretreatment methods. Gene Ontology (GO) analysis indicated that the miRNA target genes from both pretreatment methods were significantly enriched in protein binding, suggesting potential cross-species regulatory effects. Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) enrichment analysis showed that miRNAs lja-miR1511-3p_R-3_1ss2AC and gma-miR1511_R+1_1ss2AC from AR-EVLP obtained by soaking might have therapeutic potential for fatty liver and neurodegenerative diseases via the glycerophospholipid metabolism pathway. miRNAs mtr-miR164a, stu-miR477a-5p_R+1_1ss21CG, and gma-MIR162c-p5 from AR-EVLP obtained by decoction might treat cancer-related diseases through pathways such as glioma, prostate cancer, p53 signaling, Hedgehog signaling, ErbB signaling, and mitogen-activated protein kinase (MAPK) signaling. **Conclusion** AR-EVLP obtained by different pretreatment methods exhibited significant differences in characterization, protein composition, miRNA expression profiles, and associated biological functions. AR-EVLP from soaking had better quality and tended to be useful for treating diseases like fatty liver and neurodegenerative disorders, while AR-EVLP from decoction had a higher yield and tended to be geared toward treating cancer-related diseases.

Key words: *Astragali Radix*; vesicle-like nanoparticles; extraction techniques; miRNA; bioinformatics analysis

黄芪 *Astragali Radix* 是我国临床常用大宗中药材之一, 分布范围广, 资源丰富, 具有很高的药用价值^[1]; 具有补气固表、利尿托毒、排脓、敛疮生肌之功效, 在目前临床与处方中使用率极高^[2]。现代药理学研究证实, 黄芪富含多种生物活性成分, 主要包括皂苷类、黄酮类、多糖类、氨基酸及微量元素等^[1]; 这些成分共同赋予黄芪广泛的药理活性, 包括抗肿瘤、抗衰老、调节神经内分泌功能、改善能量代谢、免疫调节、抗氧化应激等^[3-6]。如王炎炎等^[7]发现黄芪多糖可以通过调控转化生长因子- β /Smad (transforming growth factor- β /Smad, TGF- β /Smad) 信号通路, 抑制结直肠癌的肝转移; 徐静鸽等^[8]发现黄芪甲苷 IV 通过抑制肿瘤进展位点 2-结缔组织生长因子 (tumor progression locus 2-connective tissue growth factor, TPL2-CTGF) 通路, 减轻肾缺血再灌注损伤后肾炎症反应与纤维化进程, 阻断急性肾损伤向慢性肾脏病转化; 余润宇等^[9]指出黄芪中毛蕊异黄酮具有较好的抗炎活性, 其抗炎机制主要涉及调控核因子- κ B (nuclear factor- κ B, NF- κ B)、酪氨酸蛋白激酶/信号转导与转录激活因子 (Janus kinase/signal transducer and activator of transcription, JAK/STAT)、环氧合酶-2/表皮生长因子受体 (cyclooxygenase-2/epidermal growth factor receptor, COX-2/EGFR)、丝裂原活化蛋白激酶 (mitogen-activated protein kinase, MAPK)、核因子 E2 相关因子/血红素氧合酶-1 (nuclear factor erythroid 2-related

factor 2/heme oxygenase-1, Nrf2/HO-1)、NOD 样受体家族含吡啶结构域蛋白 3 (NOD-like receptor family pyrin domain-containing 3, NLRP3) 等信号通路及调节免疫细胞平衡和抗氧化。

近年来, 科研人员在植物类中药中发现了囊泡样纳米颗粒 (derived extracellular vesicles-like particles, EVLP) 的存在。EVLP 是具有双层膜结构的微小囊泡, 内含生物活性脂质、蛋白质、RNA 等成分^[10]。与哺乳动物不同, 中药的 EVLP 来源天然、成分绿色, 不携带人畜共患、人类病原体, 能够不引起免疫应答直接作用于细胞中, 并且在细胞交流过程中也起着重要的作用, 能够在细胞间、物种间进行信号传导^[11]。多项研究表明, 植物 EVLP 中的 miRNA 具有跨界调控作用, 如生姜 *Zingiberis Rhizoma Recens*-EVLP 中含有的 mdo-miR7267-3p, 可靶向结合鼠李糖乳杆菌的单加氧酶, 进而引起抗炎因子白细胞介素-22 增加, 以此起到抗炎作用^[12]。红景天 *Rhodiola Crenulatae Radix et Rhizoma* 和蒲公英 *Taraxaci Herba*-EVLP 中发现, HJT-sRNA-m7 和 PGY-sRNA-6 均具有良好的抗肺纤维化和抗炎作用^[13]。这些报道为中药的现代化研究提供了新的切入点。

目前, 对于新鲜植物的 EVLP 提取, 大都将其榨汁, 从汁液中提取^[14-17]。而由于样本获取和季节限制等问题, 干燥植物的 EVLP 引起了研究者的关注。Woith 等^[18]通过琼脂糖凝胶电泳纯化与荧光可

视化、透射电镜形态观察、动态光散射粒径分析,证明了 EVLP 可耐干燥、稳定留存于干燥植物组织。有研究指出植物的 EVLP 存在于质外体和组织间隙,可与细胞壁组分结合,干燥使其保持静息态,水合浸泡可重新释放^[18-19]。目前,对于干燥植物的 EVLP 提取,主要通过浸泡和水煎使 EVLP 释放到液体中,再从液体中提取 EVLP^[20]。如李万敏等^[21]通过 PBS 缓冲液浸泡干燥远志提取了其 EVLP;梁崇豹等^[22]通过纯水煎煮提取了干燥柴胡的 EVLP。但 2 种预处理方式的作用强度、溶出环境和对生物活性成分的稳定性都有很大差异,不同的预处理方式是否会对 EVLP 表征、活性成分、生物功能造成影响,目前报道较少。

本研究以黄芪为例,通过浸泡和水煎 2 种预处理方式以超速离心法制备黄芪来源囊泡样纳米颗粒(*Astragali Radix*-derived extracellular vesicles-like particles, AR-EVLP)。对比分析 2 种预处理所得 AR-EVLP 表征、蛋白、miRNA 的差异及其预测的生物功能差异。揭示 2 种方式对 AR-EVLP 表征完整性、活性成分及功能潜能的影响,为未来 AR-EVLP 在疾病中的应用及其他植物 EVLP 预处理方式的选择提供参考。

1 仪器与材料

1.1 仪器

5417R 型台式冷冻高速离心机,德国 Eppendorf 公司;Bioanalyzer 2100 型生物分析仪,美国 Agilent Technologies 公司;Power Pac TM Basic 型通用电泳仪、T100 型核酸扩增仪,美国 Bio-Rad 公司;KC-150W 型超声波破碎仪,苏州康川电子有限公司;Optima XE-90 型超高速离心机,美国 Beckman Coulter 公司;ND 1000 型微量分光光度计、Quant Studio 5 型实时荧光定量 PCR 仪,美国 Thermo Fisher Scientific 公司;HT7700 型透射电子显微镜,日本 Hitachi 公司;DTS1070 型比色皿,宜兴奥瑞拓光学仪器有限公司;Nano Sight NS300 型纳米颗粒跟踪分析仪、Zetasizer PRO 型纳米激光粒度仪,英国马尔文帕纳科公司;Research Plus 移液器,德国 Eppendorf 公司。

1.2 药品与试剂

黄芪购自山西省大同市浑源县,经山西中医药大学傅松涛教授鉴定,为豆科黄芪属植物膜荚黄芪 *Astragalus membranaceus* (Fisch.) Bunge 的干燥根。

磷酸盐缓冲液(PBS)、纯水,武汉赛维尔生物

科技有限公司;电泳缓冲液,北京兰杰柯科技有限公司;外泌体蛋白专用裂解液,上海宇玫博生物科技有限公司;微量 BCA 蛋白质定量试剂盒,武汉博士德生物工程有限公司;SDS-PAGE 蛋白上样缓冲液(5×),武汉博士德生物工程有限公司;PAGE 凝胶银染试剂盒,北京索莱宝科技有限公司;M-MLV Reverse Transcriptase,美国 Promega 公司;SYBR Green qPCR Super Mix Kit,美国 Thermo Fisher Scientific 公司;T4 RNA Ligase 2、truncated K227Q、T4 RNA Ligase 1,纽英伦生物技术(北京)有限公司;Super Scrip™ II Reverse Transcriptase,美国 Thermo Fisher Scientific 公司;Phusion High-Fidelity DNA polymerase,纽英伦生物技术(北京)有限公司;RNA PCR Primer,杭州联川生物技术股份有限公司;RNA PCR Primer Index,杭州联川生物技术股份有限公司;Sure PAGE™,Bis-Tris,10 cm×8 cm,12%,10 wells,金斯瑞生物科技股份有限公司。

2 方法与结果

2.1 AR-EVLP 提取

2.1.1 浸泡预处理提取 AR-EVLP 选用干燥黄芪根茎 100 g,加 4 ℃、1 400 mL PBS (pH 值≈7.4,离子强度≈171.7 mmol/L),使用组织破碎机粉碎,浸泡 12 h,使用 200 目滤网滤过,于 4 ℃条件下沉 24 h 后,取上清液,在 4 ℃条件下分别以 1 000×g、3 000×g、10 000×g 依次离心 30 min,将最终所得上清液经 0.45 nm 滤膜滤过后,以 150 000×g 离心 2 h,弃上清,所得沉淀即为浸泡预处理所得 AR-EVLP。使用 600 μL PBS 将沉淀重悬,无菌封装,置于-80 ℃冰箱中保存^[23-24]。

2.1.2 水煎预处理提取 AR-EVLP 选用干燥黄芪根茎 100 g,切片后加入 1 500 mL 纯水 (pH 值≈7.0,离子强度≈0 mmol/L),升温至 100 ℃,水煎 50 min 后,经 200 目滤网滤过,收集药液。在药渣中加入水 1 000 mL,再次升温至 100 ℃,2 次水煎 50 min 后,经 200 目滤网滤过,收集药液。将 2 次提取所得的药液合并,在 95~100 ℃条件下浓缩至 200 mL 后,在 4 ℃环境中密封冷沉 24 h,取浓缩液上清于 4 ℃条件下,分别以 1 000×g、3 000×g、10 000×g 依次离心 30 min,将最终所得上清液经 0.45 nm 滤膜滤过后,以 150 000×g 离心 2 h,弃上清,所得沉淀即为水煎预处理所得 AR-EVLP。使用 600 μL PBS 将沉淀重悬,无菌封装,置于-80 ℃冰箱中保存^[23-24]。

2.2 不同预处理所得 AR-EVLP 的形态观察

取不同预处理所得 AR-EVLP 样品, 在 4 ℃ 条件下解冻后, 经 $10\,000\times g$ 离心 5 min; 吸取样品上清液各 10 μL , 分别滴加于铜网上沉淀 2 min, 滤纸吸去浮液; 吸取 3% 醋酸双氧铀 10 μL , 滴加于铜网上沉淀 2 min, 滤纸吸去浮液; 常温下干燥数分钟; 在 100 kV 下进行透射电子显微镜 (transmission electron microscope, TEM) 检测、拍照, 数据上传、关机、整理照片。重复实验 3 次。结果显示, 2 种预处理所得 AR-EVLP 皆呈茶托状, 双层膜结构。但浸泡预处理所得 AR-EVLP 膜结构清晰, 无明显破损 (图 1-A)。水煎预处理所得 AR-EVLP 可见部分破损的囊泡, 同时囊泡存在聚团现象 (图 1-B)。由此可得浸泡预处理所得 AR-EVLP 质量优于水煎预处理所得 AR-EVLP。

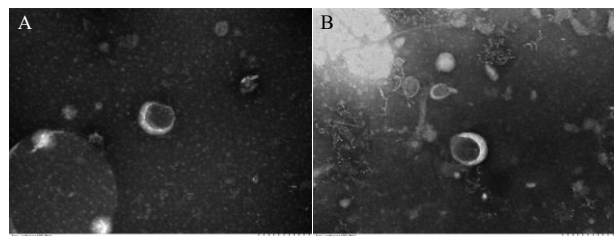


图 1 浸泡 (A) 和水煎 (B) 预处理所得 AR-EVLP 的 TEM 图

Fig. 1 TEM images of AR-EVLP obtained by soaking (A) and water-boiling (B) pretreatments

2.3 不同预处理所得 AR-EVLP 的浓度及粒径分布检测

取不同预处理所得 AR-EVLP 样品, 冰上溶解, 经超声处理 (频率 20 kHz、150 W 功率的 30%, 超声 5 s, 间隔 5 s, 重复 3 次), 以打散聚团颗粒, 用 PBS 将 AR-EVLP 稀释到一定的倍数, 得稀释液, 用注射器吸取稀释液打入纳米颗粒跟踪分析仪管路, 清洗残留, 再打入空气去除稀释液, 用稀释液清洗盖板与激光器接触面, 用无尘纸擦干; 用注射器将试剂样注入样池, 处理完毕点击 Export 输出报告, 分析数据。重复实验 3 次。结果 (图 2) 显示,

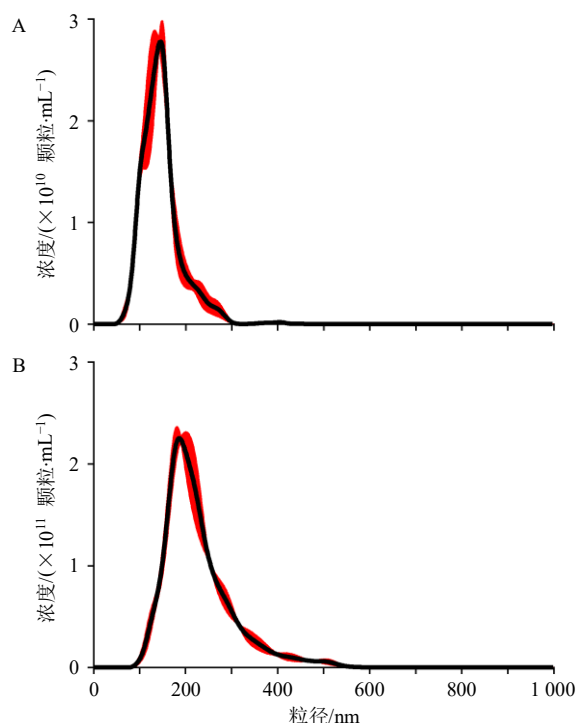


图 2 浸泡 (A) 和水煎 (B) 预处理所得 AR-EVLP 的粒径
Fig. 2 Particle sizes of AR-EVLP obtained by soaking (A) and water-boiling (B) pretreatments

相同生药量下, 浸泡预处理所得 AR-EVLP 的浓度为 $(8.92 \pm 0.09) \times 10^{12}$ 颗粒/mL, 粒径大小分布在 31.5~522.5 nm, 粒径峰值为 (140.2 ± 6.0) nm (图 2-A); 水煎预处理所得 AR-EVLP 的浓度为 $(2.79 \pm 0.05) \times 10^{13}$ 颗粒/mL, 粒径大小分布在 42.5~709.5 nm, 粒径峰值为 (194.7 ± 8.9) nm (图 2-B)。水煎预处理相比浸泡预处理所得 AR-EVLP 的粒径大小分布更广, 相对粒径较大, 提取率更高。

2.4 不同预处理所得 AR-EVLP 的 ζ 电位检测

吸取不同预处理所得 AR-EVLP 样品 10 μL , 稀释到一定倍数, 添加到比色皿中, 待纳米激光粒度仪指示灯变绿, 选择对应比色皿型号, 对其 ζ 电位进行检测, 重复实验 3 次。结果如表 1 所示, 浸泡预处理所得 AR-EVLP 的平均 ζ 电位为 (-37.89 ± 2.33) mV; 水煎预处理所得 AR-EVLP 的平均 ζ 电位为 (-10.31 ± 0.30) mV; 水煎预处理所得 AR-EVLP

表 1 不同预处理所得 AR-EVLP 的浓度、 ζ 电位、蛋白质量浓度和纯度比较 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 1 ζ potential and purity comparison of AR-EVLP obtained with different pretreatments ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

AR-EVLP 样品	浓度/(颗粒·mL ⁻¹)	ζ 电位/mV	蛋白质量浓度/($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	纯度/(颗粒· μg^{-1} 蛋白)
浸泡预处理所得	$(8.92 \pm 0.09) \times 10^{12}$	-37.89 ± 2.33	$2\,657.44 \pm 100.40$	$(3.36 \pm 0.12) \times 10^9$
水煎预处理所得	$(2.79 \pm 0.05) \times 10^{13}$	$-10.31 \pm 0.30^{**}$	$6\,164.40 \pm 160.75^{**}$	$(4.53 \pm 0.12) \times 10^9^{***}$

与浸泡预处理所得 AR-EVLP 样品比较: $^{**}P < 0.01$ $^{***}P < 0.001$; 表 7 同。

$^{**}P < 0.01$ $^{***}P < 0.001$ vs AR-EVLP sample obtained by soaking pretreatment; Same as table 7.

的 ζ 电位绝对值相对较小。

2.5 不同预处理所得 AR-EVLP 的蛋白含量检测

取 3 次不同预处理所得 AR-EVLP 样品各 20 μL , 向 AR-EVLP 中加入等体积裂解液, 混匀后在冰上裂解 10 min, 于 4 $^{\circ}\text{C}$ 以 11 200 $\times g$ 离心 5 min 取上清, 按照 4:1 的比例加入 SDS-PAGE 蛋白上样缓冲液 (5 $\times$), 涡旋后置于 100 $^{\circ}\text{C}$ 变性 15 min。使用微量 BCA 蛋白质定量试剂盒测量蛋白质量浓度。经 3 次 BCA 检测, 浸泡预处理所得 AR-EVLP 的总蛋白质量浓度为 (2 657.44 $\pm$ 100.40) $\mu\text{g/mL}$, 水煎预处理所得 AR-EVLP 的总蛋白质量浓度为 (6 164.40 $\pm$ 160.75) $\mu\text{g/mL}$ (表 1)。将 2 种预处理提取 AR-EVLP 颗粒浓度与蛋白质量浓度相比, 得到浸泡预处理所得 AR-EVLP 的纯度为 (3.36 $\pm$ 0.12) $\times 10^9$ 颗粒/ μg 蛋白, 水煎预处理所得 AR-EVLP 的纯度为 (4.53 $\pm$ 0.12) $\times 10^9$ 颗粒/ μg 蛋白 (表 1)。这一结果表明, 2 种预处理所得 AR-EVLP 的纯度, 均高于 T/CRHA001—2021《人间充质干细胞来源的小细胞 EVLP》团体标准中的 1 $\times 10^8$ 颗粒/ μg 蛋白^[25]。且水煎预处理所得 AR-EVLP 的蛋白质量浓度高于浸泡预处理所得 AR-EVLP ($P<0.001$)。

2.6 不同预处理所得 AR-EVLP 蛋白相对分子质量分布

将“2.5”项中 AR-EVLP 蛋白变性后, 以每孔 20 μL 进行十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳, 80 V 恒压电泳 30 min 后, 转 120 V 恒压电泳 90 min。电泳结束后, 使用蛋白银染试剂盒染色, 染色结束后使用凝胶成像系统进行观察。银染结果 (图 3) 显示, 浸泡预处理所得 AR-EVLP 蛋白的相对分子质量主要分布在 $1.5\times 10^4\sim 2.0\times 10^4$ 、 $2.5\times 10^4\sim 3.5\times 10^4$ 、 $4.5\times 10^4\sim 7.5\times 10^4$; 水煎预处理所得 AR-EVLP 蛋白的相对分子质量主要分布在 $4.5\times 10^4\sim$

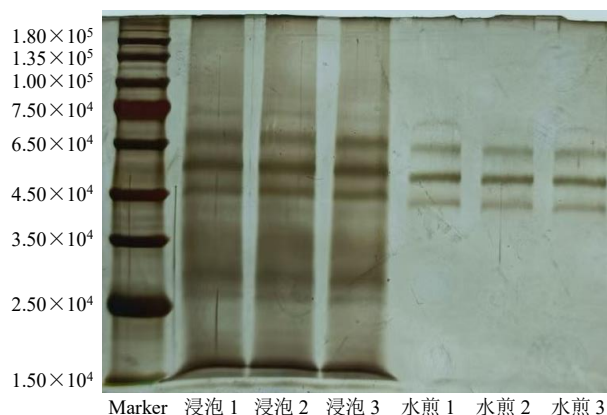


图 3 不同预处理所得 AR-EVLP 蛋白分布

Fig. 3 Distribution of AR-EVLP proteins obtained with different pre-treatments

7.5×10^4 ; 与水煎预处理相比, 浸泡预处理所得 AR-EVLP 蛋白成分分布范围更广。

2.7 sRNA 文库制备和高通量测序

采用 Trizol 传统法, 提取不同预处理所得 AR-EVLP 的总 RNA, sRNA 测序文库制备采用 TruSeq Small RNA Sample Prep Kits 试剂盒。文库制备工作完成后, 对构建好的文库, 使用 Illumina Hiseq 2000/2500 进行测序, 测序读长为单端 50 bp。数据质控结果 (表 2) 显示, 浸泡预处理和水煎预处理所得 AR-EVLP 的 Q20 [测序数据中的 Q20 和 Q30 是 Phred 质量得分, 用于评估每个碱基的测序准确度, Q20 表示碱基的测序准确率为 99%, 即错误率 1% (每 100 个碱基中允许 1 个错误), Q30 表示碱基的测序准确率为 99.9%, 即错误率 0.1% (每 1 000 个碱基中允许 1 个错误); Q20 是常规数据质量的基本门槛, Q30 是高质量数据的重要指标, 通常要求 Q30 以上的碱基比例 $>80\%$ 或更高] 分别为 99.56% 和 99.61%, Q30 分别为 97.01% 和 97.53%, 结果符合实验设计要求。

表 2 sRNA 高通量测序数据质量统计汇总

Table 2 sRNA sequencing data quality control

样品名称	Total_Reads	Total_Bases	A/%	T/%	C/%	G/%	N/%	Q20/%	Q30/%	GC/%
浸泡预处理所得AR-EVLP	12 914 401	658 634 451	22.91	20.45	28.28	28.36	0.01	99.56	97.01	56.64
水煎预处理所得AR-EVLP	14 049 053	716 501 703	23.42	22.46	25.40	28.70	0.02	99.61	97.53	54.10

Total_Reads、Total_Bases 分别为下机数据总的 reads、bases 数量; A、T、C、G、N 为碱基。

Total_Reads and Total_Bases are the total number of reads and bases of offline data, respectively; A, T, C, G and N are bases.

2.8 miRNAs 的筛选与鉴定

使用 Rfam 数据库 (<ftp://ftp.ebi.ac.uk/pub/databases/Rfam>) 对 sRNA 进行注释。使用 ACGT101-miR (v4.2) 进行 miRNA 的数据分析, 分析流程如

下: (1) 去除 3' 接头和垃圾序列, 获取 CleanData; (2) sRNA 长度筛选: 保留长度范围为 18~25 nt; (3) 各种 RNA 数据库比对分析: 将剩余序列比对 mRNA (<http://www.gpgenome.com/species/109>)、

RFam、Repbse (<http://www.girinst.org/repbse>) 数据库 (不含 miRNA), 并进行滤过, 将滤过后的数据称为 Valid 数据, 随后基于 Valid 数据进行 miRNA 的比对鉴定; (4) miRNA 鉴定: 获取长度滤过、RFam

等数据库滤过之后的 valid, 比对前体和基因组进行 miRNA 鉴定。结果表明, 滤过后的 Valid 数据的 total 及 unique 长度范围为 18~26 nt (表 3), 经鉴定 miRNA 长度主要分布在 20~21 nt (表 4)。

表 3 多个数据库对比滤过后 Valid 数据的 total 和 unique 长度分布统计

Table 3 Statistics of total and unique lengths distribution of Valid data after filtering across multiple databases

样品名称	total占比/%										unique占比/%									
	18 nt	19 nt	20 nt	21 nt	22 nt	23 nt	24 nt	25 nt	26 nt		18 nt	19 nt	20 nt	21 nt	22 nt	23 nt	24 nt	25 nt	26 nt	
浸泡预处理所得AR-EVLP	19.27	11.53	14.65	20.09	13.20	7.41	8.17	3.24	2.42	6.53	7.22	15.67	20.41	16.21	9.75	17.56	3.99	2.66		
水煎预处理所得AR-EVLP	3.20	4.94	23.27	38.12	14.44	9.10	3.82	1.88	1.21	5.63	7.86	25.97	24.33	13.23	12.03	5.74	3.03	2.19		

表 4 比对前体和基因组鉴定的 unique miRNA 长度分布

Table 4 Length distribution of miRNAs identified by precursor comparison and genome analysis

长度/ nt	unique miRNA		长度/ nt	unique miRNA	
	数量/个	占比/%		数量/个	占比/%
18	15	5.42	22	27	9.75
19	31	11.19	23	8	2.89
20	101	36.46	24	3	1.08
21	91	32.85	25	1	0.36

2.9 不同预处理所得 AR-EVLP miRNA 差异表达分析

将测序数据与 miRBase 数据库进行比对, 结果发现浸泡预处理所得 AR-EVLP 共检测到 223 个 miRNA, 包括 70 种已知 miRNAs, 其中, 表达量较高的为 mtr-miR166c_L+2R-2、mtr-miR166a、peu-miR2916_L-2R-3_1ss6AG、mtr-miR159a、gma-miR396b-5p 5 种; 153 种预测新 miRNA, 其中, 表达量较高的为 PC-3p-2845_403 (表 5); 新 miRNAs 占比为 68.61% (表 6)。水煎预处理所得 AR-EVLP 共检测到 114 个 miRNA, 包括 76 种已知 miRNAs, 其中, 表达量较高的为 mtr-miR166c_L+2R-2、mtr-miR166a、mtr-miR168b、mes-miR535c_L-1R+1、mtr-miR166a_1ss15AG 5 种; 38 种预测新 miRNA, 其中, 表达量较高的为 PC-3p-261_2247 (表 5); 新 miRNAs 占比为 33.33% (表 6)。两者有 60 个共表达 miRNA (表 6), 对 2 种预处理所得 miRNA 进行差异性分析, 2 种预处理所得 AR-EVLP 的 miRNA 表达倍数变化, 以对数倍数变化 (logarithmic fold change, $\log_2FC$) 表示, 发现水煎预处理和浸泡预处理所得 AR-EVLP, 有 219 个差异性表达的 miRNA ($|\log_2FC| > 1$ 且 $P < 0.05$), 其中, 相比浸泡预处理, 水煎预处理所得 AR-EVLP 上调的 miRNA 有 33 个, 下调的 miRNA 有 186 个 (图 4、5)。

2.10 实时荧光定量 PCR

分别选取 2 种预处理所得 AR-EVLP 的 3 个独立样本, 选取浸泡预处理中含量较多的 lja-miR1511-3p_R-3_1ss2AC、水煎预处理中含量较多的 mtr-miR168b、2 种预处理中含量相近的 gma-MIR5368-p5_1ss1TC 作为 miRNA 测序结果的验证对象; 并将 2 种预处理所得 AR-EVLP 的 miRNA 中表达相近的 mtr-miR166a_L+2R-2_1ss20CT 作为内参基因。通过茎环法设计 miRNA 引物, 使用 M-MLV Reverse Transcriptase 试剂盒逆转录成 cDNA, 使用 SYBR Green qPCR SuperMix kit 在荧光定量 PCR 仪上进行 PCR 反应。结果发现 lja-miR1511-3p_R-3_1ss2AC 在浸泡预处理所得 AR-EVLP 中表达量较高, mtr-miR168b 在水煎预处理所得 AR-EVLP 中表达量较高, 且都呈现出明显差异性。gma-MIR5368-p5_1ss1TC 在 2 种预处理所得 AR-EVLP 中表达量相似 (表 7)。这一结果与 miRNA 测序结果相符合。

2.11 AR-EVLP 差异表达 miRNA 的靶基因预测与生物信息学分析

使用 TargetScan (v5.0)、miRanda (v3.3a) 2 款软件对不同预处理所得 AR-EVLP 显著差异性表达的 miRNA ($|\log_2FC| > 1$ 且 $P < 0.05$) 分别进行靶基因预测, 对 2 款软件预测出的靶基因分别按照每款软件的评分标准进行筛选。TargetScan 算法中去除背景得分百分位数 (context score percentile) 小于 50 的靶基因, miRanda 算法中去除最大自由能大于 -10 的靶基因, 最后取此 2 款软件的交集作为差异表达 miRNA 的最终靶基因。将不同预处理所得 AR-EVLP 上调已知 miRNA 靶基因进行 GO 富集。结果显示, 2 种预处理所得 AR-EVLP 上调已知 miRNA 的靶基因在生物过程方面均富集在磷酸化、蛋白质磷酸化、细胞内信号转导等过程。在细胞组分方面

表 5 浸泡和水煎预处理所得 AR-EVLP 中前 20 位已知和预测新 miRNA 的相对表达量

Table 5 Relative expression levels of top 20 known and predicted new miRNAs in AR-EVLP obtained by soaking and water-boiling pretreatments

编号	浸泡预处理所得AR-EVLP				水煎预处理所得AR-EVLP			
	已知miRNAs	相对表达量	预测新miRNAs	相对表达量	已知miRNAs	相对表达量	预测新miRNAs	相对表达量
1	mtr-miR166c_L+2R-2	1 256.25	PC-3p-2845_403	385.49	mtr-miR166c_L+2R-2	68 548.58	PC-3p-261_2247	3 986.29
2	mtr-miR166a	1 243.74	PC-3p-4589_278	197.29	mtr-miR166a	9 833.85	PC-3p-6636_202	694.57
3	peu-miR2916_L-2R-3_1ss6AG	639.64	PC-5p-14527_97	183.08	mtr-miR168b	5 283.99	PC-5p-12724_110	344.65
4	mtr-miR159a	449.45	PC-5p-6485_206	148.96	mes-miR535c_L-1R+1	1 979.96	PC-5p-32434_41	239.14
5	gma-miR396b-5p	305.89	PC-5p-6103_218	130.77	mtr-miR166a_1ss15AG	1 378.59	PC-3p-12922_109	191.67
6	mtr-miR396b-3p_R-1	270.64	PC-3p-6915_195	125.65	mtr-miR164a	1 055.04	PC-3p-4589_278	186.39
7	lus-MIR169i-p5_1ss10CT	247.90	PC-5p-8269_167	113.71	ath-miR164b-3p_2ss10AT16AC	826.45	PC-5p-19607_71	181.12
8	mtr-miR319a-3p	190.47	PC-5p-12566_112	98.93	stu-miR477a-5p_R+1_1ss21CG	609.29	PC-3p-2845_403	80.89
9	mtr-miR166a_L+2R-2_1ss20CT	154.08	PC-5p-16016_88	84.72	mtr-miR319a-3p	573.24	PC-5p-31816_42	56.27
10	gma-MIR5368-p5_1ss1TC	137.88	PC-5p-22420_62	74.20	peu-miR2916_L-2R-3_1ss6AG	448.39	PC-5p-81466_16	56.27
11	lja-miR1511-3p_R-3_1ss2AC	135.89	PC-3p-69976_18	69.37	mtr-miR408-3p_1ss1AC	413.22	PC-5p-81452_16	56.27
12	gma-miR1511_R+1_1ss2AC	135.89	PC-5p-11816_119	64.82	gma-miR162a_R+1	390.36	PC-3p-47569_27	47.48
13	gma-MIR5368-p3_1ss16CA	72.78	PC-5p-43089_30	63.68	gma-miR394a-5p	363.99	PC-5p-50582_26	45.72
14	gma-miR396b-3p	68.23	PC-5p-20997_66	56.86	ath-miR8175_L-2	277.83	PC-5p-58469_22	38.68
15	mtr-miR166a_L-1	61.97	PC-3p-16958_83	50.03	gma-miR396b-5p	262.00	PC-5p-6103_218	33.41
16	mtr-miR390	60.27	PC-5p-15115_93	50.03	vvi-miR2111-5p	221.56	PC-3p-25731_53	29.89
17	mtr-miR168b	55.15	PC-3p-22117_63	42.07	mtr-miR159a	189.03	PC-3p-45221_29	29.89
18	mtr-miR159a_R-1	47.48	PC-5p-37913_35	40.94	mtr-miR166a_L+2R-2_1ss20CT	149.46	PC-5p-6485_206	29.89
19	vvi-miR3630-3p_L-3R-1_1ss21AG	35.25	PC-3p-27395_50	39.23	mtr-miR398b_1ss20TG	147.71	PC-5p-92129_14	24.62
20	mtr-miR168c-3p	31.84	PC-5p-21991_63	35.82	mtr-miR166g-5p	147.71	PC-3p-110008_11	19.34

表 6 不同预处理所得 AR-EVLP 中 miRNA 数量及已知 miRNA 和预测新 miRNA 比例

Table 6 Number of miRNAs in AR-EVLP obtained from different preprocessing methods and proportion of known miRNAs versus predicted new miRNAs

AR-EVLP样品	总miRNA 数量/个	共同miRNA 数量/个	已知miRNA 占比/%	预测新miRNA 占比/%
浸泡预处理所得	223	60	31.39	68.61
水煎预处理所得	114	60	66.67	33.33

均显著富集在细胞质、胞质溶胶、细胞核等核心细胞结构。在分子功能方面均高度富集在蛋白结合、三磷酸腺苷（adenosine triphosphate, ATP）结合、金属离子结合等功能。值得注意的是，浸泡预处理和水煎预处理所得 AR-EVLP 上调已知 miRNA 的靶基因在蛋白结合的富集均最为显著（图 6）。

将不同预处理所得 AR-EVLP 上调已知 miRNAs 靶基因进行 KEGG 富集。浸泡预处理所得 AR-EVLP 上调已知 miRNA 的靶基因富集显著的前 20 条通路包括甘油磷脂代谢、鞘糖脂生物合成-神经节苷脂系

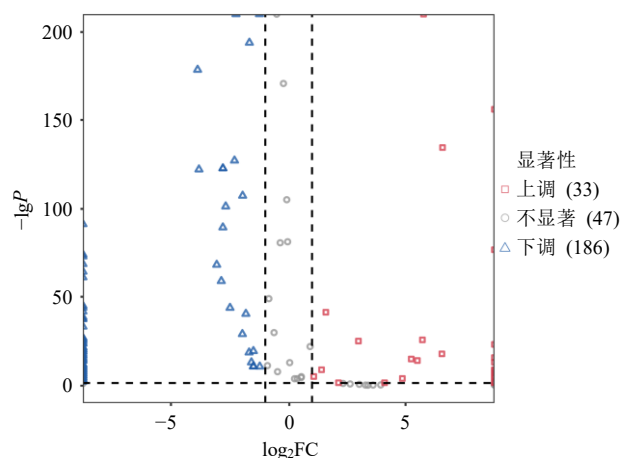


图 4 不同预处理所得 AR-EVLP miRNA 测序分析火山图
Fig. 4 Volcano plot of miRNA sequencing analysis of AR-EVLP obtained from different pretreatments

列、炎症介质对 TRP 通道的调节、昼夜节律同步化、胰岛素分泌、催产素信号通路、溶酶体、自噬（动物）、矿物质吸收等；其中，甘油磷脂代谢是富集最显著的通路（图 7-A）。通过分析发现，在油磷脂代谢通路中显著富集的 miRNA 为 lja-miR1511-

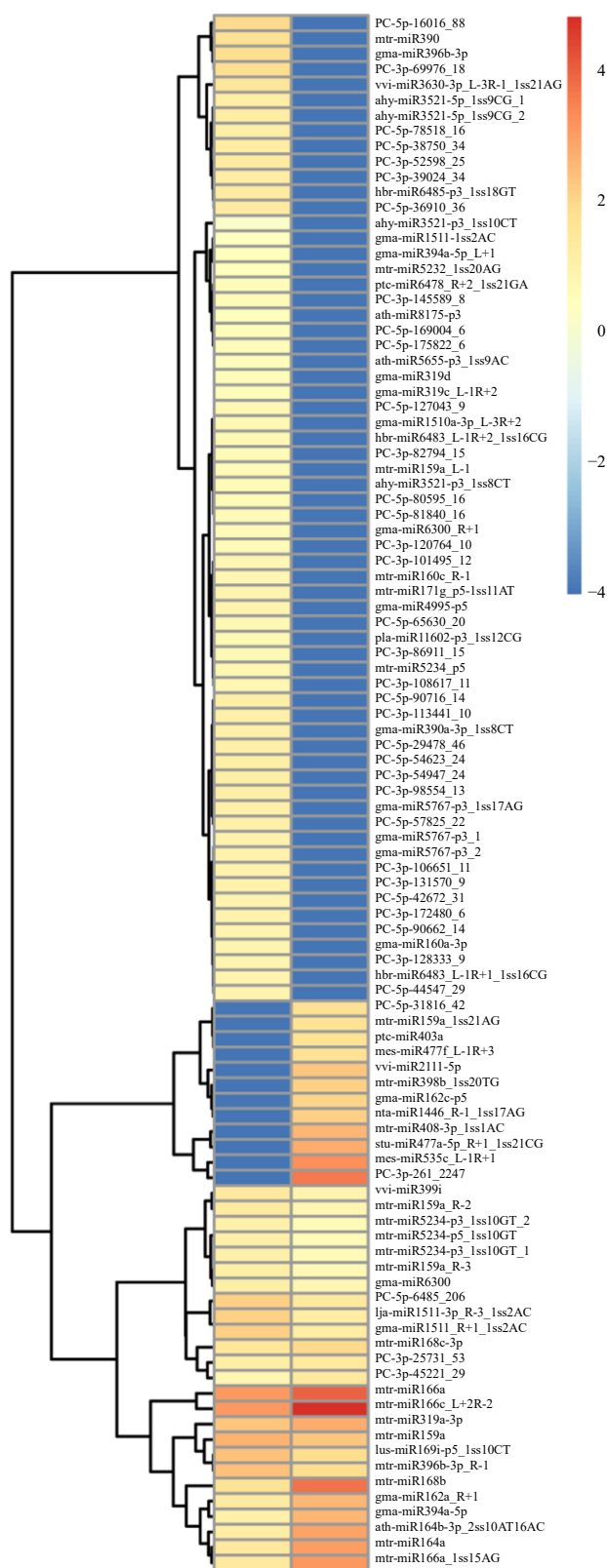


图 5 不同预处理所得 AR-EVLP miRNA 测序分析的层次聚类热图

Fig. 5 Hierarchical clustering heatmap of miRNA sequencing analysis of AR-EVLP obtained from different pretreatments

3p_R-3_1ss2AC 和 gma-miR1511_R+1_1ss2AC。水煎预处理所得 AR-EVLP 上调已知 miRNA 的靶基因富集显著的前 20 条通路包括癌症通路、轴突导向、Hippo 信号通路、致心律失常性右室心肌病、谷氨酸能突触、心肌细胞中的肾上腺素能信号、Rap1 信号通路、胶质瘤、FoxO 信号通路、钙信号通路、p53 信号通路、Hedgehog 信号通路等；其中，癌症通路是富集最显著的通路且富集基因数最多（图 7-B）。在相关癌症通路中显著富集的 miRNA 为 tr-miR164a、stu-miR477a-5p_R+1_1 ss21CG、gma-MIR162c-p5。

2.12 统计学分析

所有具有生物学重复的数据均采用 $\bar{x} \pm s$ 表示，使用 Graphpad Prism 9.5.1 软件进行统计分析。2 组间差异比较使用独立样本 t 检验，多组间差异比较采用单因素方差分析。

3 讨论

植物 EVLP 具有类似于动物细胞 EVLP 一样的结构特征，含多种蛋白质、脂质、DNA 和多种复合 RNA，可以参与细胞之间的信息传递和材料交换并且可以介导物种间交流，是一种新兴的活性物质成分^[26]。目前，许多植物 EVLP，已被科研人员从黄芪、人参、生姜、姜黄和芦荟等新鲜中药中分离出来^[15-16,27-28]。并且随着研究的深入，研究者开始从干燥的植物提取 EVLP。

本研究通过浸泡预处理和水煎预处理提取 AR-EVLP 进行对比。首先，2 种预处理所得 AR-EVLP 的纯度均明显高于 T/CRHA001—2021《人间充质干细胞来源的小细胞 EVLP》团体标准中的 1×10^8 颗粒/ μg 蛋白^[25]；这一结果证明了本研究的提取纯度符合标准。此外，本研究发现水煎预处理所得 AR-EVLP 膜结构可见部分破损，浸泡预处理所得 AR-EVLP 膜结构较为完整。其原因可能与预处理时的温度、pH 值有关。有研究指出，在中性 pH 值环境且常温条件下，能够长时间保持囊泡结构完整。然而，在强酸、强碱或高温等极端条件下，囊泡结构容易遭到破坏^[29]。水煎预处理中温度可高达 100°C ，很有可能对囊泡造成伤害。此外，本研究中水煎预处理的 EVLP 的 ζ 电位绝对值较小，这一结果也对应了高温处理后 EVLP 结构完整性被破坏这一结论。

鉴于 EVLP 高生物相容性、稳定性、低免疫原性、天然靶向与屏障穿透、可工程化改造等特点，在未来的应用中可以以浸泡预处理所得 EVLP 作为

表 7 不同预处理所得 AR-EVLP 的差异 miRNA 验证 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 7 Validation of differential miRNAs in AR-EVLP obtained from different pretreatments ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

AR-EVLP 样本	lja-miR1511-3p_R-3_1ss2AC/ mtr-miR166a_L+2R-2_1ss20CT	mtr-miR168b/ mtr-miR166a_L+2R-2_1ss20CT	gma-MIR5368-p5_1ss1TC/ mtr-miR166a_L+2R-2_1ss20CT
浸泡预处理所得	1.00 ± 0.07	1.00 ± 0.08	1.00 ± 0.09
水煎预处理所得	0.16 ± 0.02**	214.70 ± 13.08***	0.97 ± 0.09

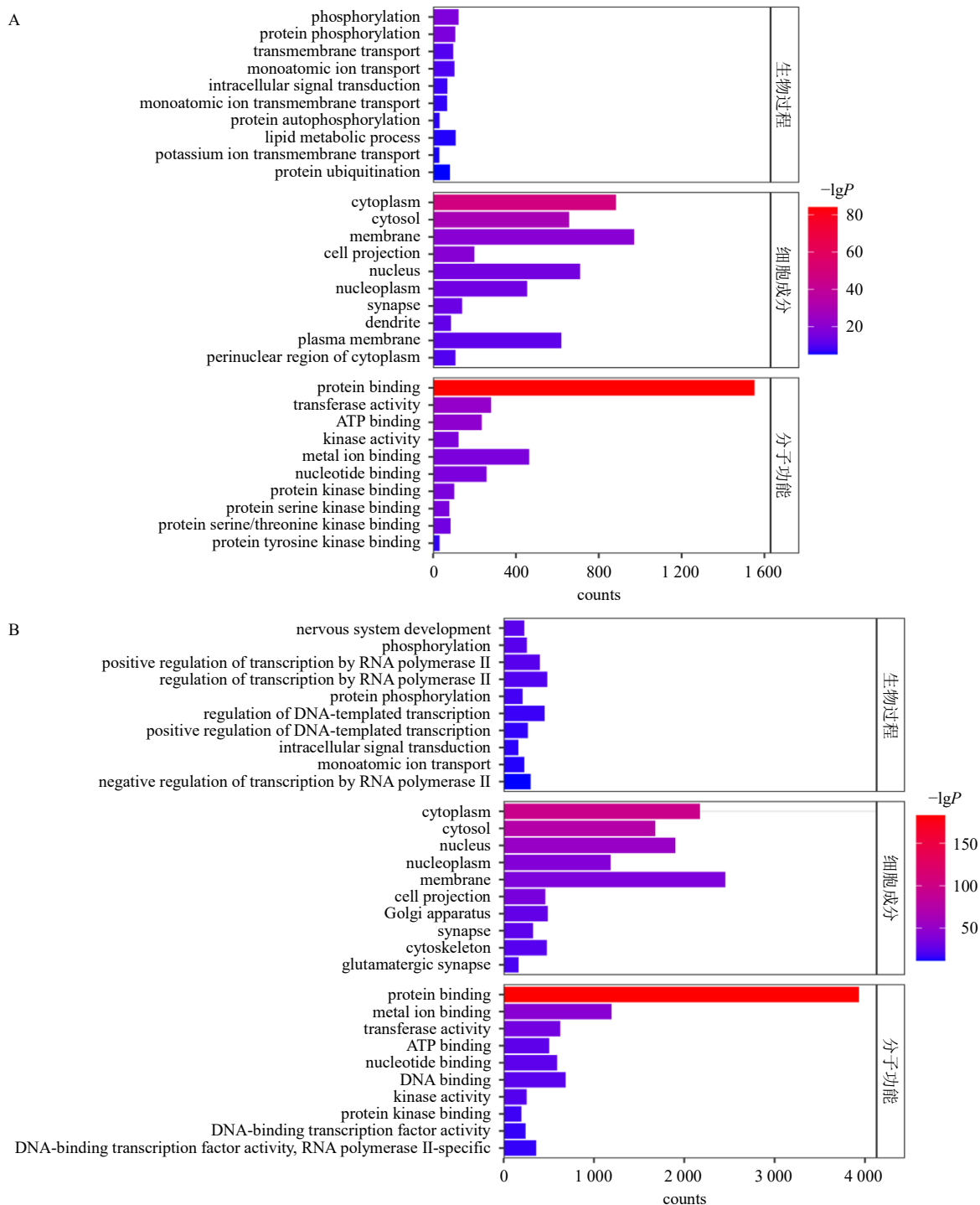


图 6 浸泡 (A) 和水煎 (B) 预处理所得 AR-EVLP 上调已知 miRNA 靶基因的 GO 富集柱状图

Fig. 6 GO enrichment bar charts of known miRNA target genes upregulated on AR-EVLP after soaking (A) and water decoction (B) pretreatments

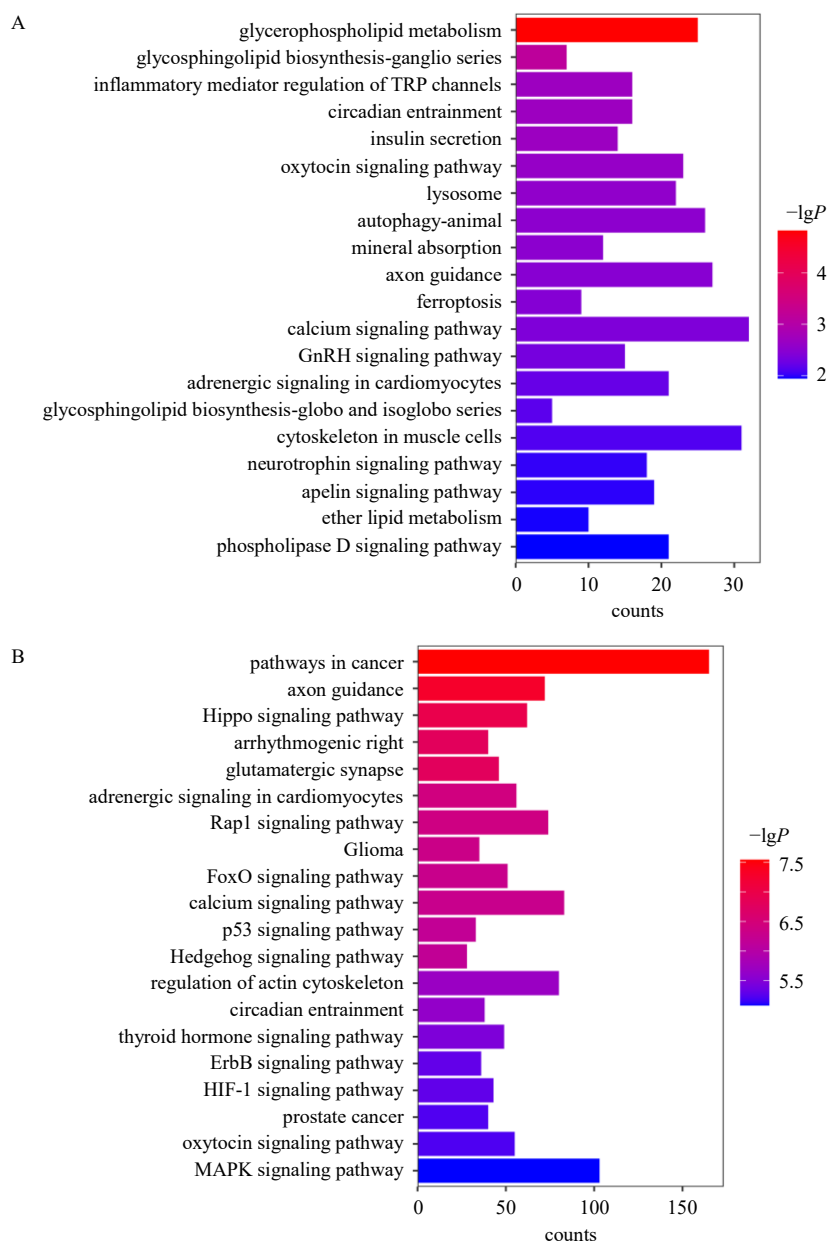


图 7 浸泡 (A) 和水煎 (B) 预处理所得 AR-EVLP 上调已知 miRNA 靶基因的 KEGG 富集柱状图

Fig. 7 KEGG enrichment bar charts of known miRNA target genes upregulated on AR-EVLP after soaking (A) and water decoction (B) pretreatments

载体负载药物或其他有效成分在疾病中应用^[23,30]。如 Zhang 等^[31]使用生姜-EVLP 成功装载化疗药物多柔比星 (doxorubicin, Dox), 并被结肠癌细胞优先选择性地内吞, 且与游离 Dox 相比, 靶向性更强、效果更佳, 不良反应极小。Zeng 等^[28]通过共孵法将光敏化剂吖啶菁绿 (indocyanine green, ICG) 装入芦荟 Aloe-EVLP, 发现芦荟-EVLP 在 ICG 加载 30 d 后表现出极高稳定性, 且能有效抑制黑色素瘤的生长。这些发现表明, 植物 EVLP 对装载药物在靶向性、安全性及对结构和功能的保护方面均具有显著

优势, 也证明了本研究中浸泡预处理所得 AR-EVLP 的价值。

高温不仅能破坏细胞膜性结构, 还能使中药材中的有机酸、无机盐大量溶出, 导致溶液 pH 值下降 (如酸性中药) 或离子强度升高, EVLP 表面电荷会被中和, 易发生聚集融合, 形成大粒径囊泡^[32]; 如 Kim 等^[32]研究发现随着温度的升高 EVLP 会融合成更大的囊泡; 这与本研究中水煎预处理所得 AR-EVLP 相较浸泡预处理所得 AR-EVLP 粒径较大相符。本研究还发现, 相对于浸泡预处理, 水煎预

处理 EVLP 产率和蛋白含量更高。这一现象可能与高温破壁、热促蛋白溶出有关。相较于浸泡预处理的冷浸,仅靠渗透扩散,细胞壁完整,释放效率极低,而高温会使植物细胞壁(纤维素、木质素、果胶)热变性崩解,细胞破裂更充分,EVLP 释放量提升^[23];高温还能使膜蛋白和胞质蛋白变性、舒展、易溶,使单位体积总蛋白更高^[33]。

为对比 2 种预处理所得 AR-EVLP 的生物功能差异,对 AR-EVLP 进行了 miRNA 测序。结果发现 2 种预处理所得 AR-EVLP 存在较大差异,浸泡预处理所得 AR-EVLP 中共检测到 223 个 miRNA,水煎预处理所得 AR-EVLP 共检测到 114 个 miRNA,其中两者仅有 60 个共表达 miRNA。造成这一现象的原因可能与预处理的温度有关。Xie 等^[34]指出干燥、机械处理、加热以及受损植物细胞释放的 RNase 可能是导致 miRNA 降解的原因;并使用琼脂糖凝胶电泳测定了从煮沸提取物中分离出的 RNA,发现几乎无清晰 rRNA 条带。这些结果说明高温可能导致 miRNA 降解。

相反,另有研究指出植物的 miRNA 与 Argonaute 2 蛋白结合或被封装在纳米颗粒中(如外泌体和微囊泡),可能保护 miRNA 免受降解^[35-37]。并有研究证明植物中的 miRNA 会在 3'末端加上甲基化修饰,这样能预防被降解,不易被破坏^[38];水煎后,其中仍保留稳定性强的 miRNA,可能作为药效发挥的主要活性成分^[39]。Chin 等^[40]研究指出西蓝花里都含有高水平 miR159,水煮后,在西蓝花里仍能检测到 miR159 的存在。沈朝斌等^[41]首次明确黄芪饮片煎煮液中含有大量小分子 RNA,并指出经干燥、炮制、加热和微波处理后,其仍存在保守或非保守的 miRNA。综上所述,关于温度对植物 EVLP 中 miRNA 的影响还需要进一步验证。

另外,对于 2 种预处理所得 AR-EVLP 的 miRNA 的差异现象还有可能与高温促进自组装有关,相对于浸泡预处理仅吸水膨胀,细胞未完全破裂,提取的 AR-EVLP 与原生 AR-EVLP 更为相近。而水煎预处理过程中高温使细胞彻底裂解,除原生 AR-EVLP 外,形成大量自组装 AR-EVLP。Zhu 等^[42]指出高温提取 EVLP 过程中促进自发自组装。热环境与溶剂环境会促进分子间相互作用(包括二硫键形成、疏水效应及氢键作用),从而驱动纳米结构的形成。胡静雯等^[43]指出中药自组装纳米颗粒极易受温度、加热时间、pH 值等因素的影响,在不同条

件下的纳米颗粒稳定性均有所变化。

本研究在 GO 富集分析中发现,不同预处理所得 AR-EVLP 上调的已知 miRNAs 靶基因在生物过程、细胞组分、分子功能等方面富集到多种相同的 GO 条目。值得注意的是,浸泡预处理和水煎预处理所得 AR-EVLP 上调已知 miRNA 的靶基因在蛋白结合条目富集均为最显著,说明 AR-EVLP 中的 miRNA 靶基因倾向于编码,能和其他蛋白结合,形成复合物,参与信号调控。进一步说明了 AR-EVLP 跨物种调控的潜能。2018 年 Cai 等^[44]将拟南芥分泌的含 miRNA 的 EVLP 输送到真菌病原体中,发现含 miRNA 的 EVLP 在感染部位积累,并被真菌细胞吸收,沉默真菌毒力基因(如 BcDCL1/2、BcSOD1)。Liu 等^[45]首次证实紫苏叶-EVLP 可通过携带 pab-miR-396a-5p 实现跨物种调控,靶向哺乳动物 HSP90/IL-17 信号通路治疗银屑病,这为植物 EVLP 的跨界通讯机制提供了新的实验证据。

2 种预处理所得 AR-EVLP 上调的已知 miRNA 的靶基因高度富集在蛋白结合条目,说明这些 miRNA 的下游靶标核心功能与蛋白结合相关的分子互作有关,而这正是 miRNA 发挥跨物种调控的关键功能通路。通过 KEGG 富集分析发现,浸泡预处理所得 AR-EVLP 的 miRNA 中的 lja-miR1511-3p_R-3_1ss2AC 和 gma-miR1511_R+1_1ss2AC 的靶基因在甘油磷脂代谢通路富集尤为显著。甘油磷脂中的磷脂酰胆碱可促进肝脏内极低密度脂蛋白的组装与分泌,帮助转运多余脂肪,对脂肪肝有预防和辅助改善作用。如 Bai 等^[46]发现改善甘油磷脂代谢,能缓解非酒精性脂肪肝进展。除此之外,甘油磷脂中的磷脂酰乙醇胺、磷脂酰胆碱是神经髓鞘的重要组成部分,可加快神经冲动的传导速度,对胎儿/婴幼儿神经发育、成年人认知功能维持都有重要作用。如 Qian 等^[47]指出异常的甘油磷脂代谢可能是阿尔茨海默病早期病理过程,促进阿尔茨海默病的发生和发展。

值得注意的是,目前有多项研究证明黄芪或其有效成分对脂肪肝和神经系统退行性疾病具有治疗作用^[48-49];这些都提示 AR-EVLP 对脂肪肝和神经系统退行性疾病具有治疗潜能。与浸泡预处理不同的是,水煎预处理所得 AR-EVLP 的 miRNA 中 mtr-miR164a、stu-miR477a-5p_R+1_1ss21CG、gma-MIR162c-p5 的靶基因在癌症通路中显著富集,另外还富集在胶质瘤、前列腺癌、p53 信号通路、

Hedgehog 信号通路、ErbB 信号通路、MAPK 信号通路, 这些通路均是与癌症相关的重要通路^[50-53]。这证明了水煎预处理所得 AR-EVLP 可能在癌症中起重要作用。近年来, EVLP 在癌症领域的研究逐渐增加, 多种 EVLP 已显示出对癌症的良好治疗效果, 特别是在肿瘤免疫抑制微环境的调控作用中具有良好的应用前景^[54]。如 Yan 等^[55]使用鸦胆子-EVLP 向 4T1 细胞递送了 10 个功能性 miRNA, 发现可以通过调控磷脂酰肌醇 3-激酶/蛋白激酶 B/哺乳动物雷帕霉素靶蛋白 (phosphoinositide 3-kinase/protein kinase B/mammalian target of rapamycin, PI3K/Akt/mTOR) 信号通路并促进活性氧簇/半胱天冬酶 (reactive oxygen species/caspase, ROS/Caspase) 介导的凋亡, 显著减缓 4T1 细胞的生长和转移。

植物 EVLP 因天然来源、低免疫原性、高生物利用度等优势, 在疾病治疗与健康调理中具有广阔应用潜力。此前关于干燥植物 EVLP 的预处理多采用浸泡和水煎法, 但 2 种不同的处理方式是否会引引起植物 EVLP 理化性质与生物学功能的差异, 鲜有文章报道。本研究结果显示, 相对水煎预处理, 浸泡预处理所得 AR-EVLP 的囊泡完整性较好, 这一发现可以为未来使用浸泡预处理提取的 EVLP 作为载体负载药物或其他有效成分治疗疾病提供基础。此外, 浸泡预处理所得 AR-EVLP 在甘油磷脂代谢通路富集明显, 这提示其在脂肪肝、神经系统退行性疾病等疾病中应用的可能性。与浸泡预处理相比, 水煎预处理在提取效率方面更有优势, 并且其在癌症相关通路中高度富集。在未来的癌症研究中可以以水煎预处理所得 AR-EVLP 作为新研究方向。本研究首次系统证实, 浸泡与水煎预处理可显著影响 AR-EVLP 的物理特性及 miRNA 功能取向。并分析了 2 种预处理所得 AR-EVLP 的应用方向。为其他植物 EVLP 的研究提供了参考, 也为黄芪等传统中药的现代化开发提供了新路径。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 张淑娟, 张育贵, 牛江涛, 等. 黄芪的研究进展及其质量标志物预测分析 [J]. 中华中医药学刊, 2022, 40(2): 151-155.
- [2] 杨舒涵, 李骁, 张思媛, 等. 蒙古黄芪内生真菌菌群结构、多样性及其对 8 种病原菌的拮抗活性 [J]. 中草药, 2025, 56(19): 7178-7185.
- [3] Xia H J, He W J, Lv C H, et al. The inhibitory effect of *Astragalus* flavone extract on hyperuricemia and its underlying molecular mechanism by targeting JNK/AP-1/NLRP3/IL-1 β signaling pathway [J]. *Phytomedicine*, 2025, 140: 156622.
- [4] Shen J, Zhao Y B, Cui W. *Astragalus mongholicus* Bunge extract improves ulcerative colitis by promoting PLCB2 to inhibit colonic epithelial cell pyroptosis [J]. *J Ethnopharmacol*, 2024, 334: 118554.
- [5] Chen R Q, Li Y T, Zuo L, et al. *Astragalus* polysaccharides inhibits tumor proliferation and enhances cisplatin sensitivity in bladder cancer by regulating the PI3K/AKT/FoxO1 axis [J]. *Int J Biol Macromol*, 2025, 311: 143739.
- [6] Bai X Y, Wei H, Liu G Q, et al. *Astragalus* polyphenols attenuates doxorubicin-induced cardiotoxicity by activating the PI3K/AKT/NRF2 pathway [J]. *PLoS One*, 2025, 20(2): e0319067.
- [7] 王炎炎, 杨世发, 孙维义, 等. 黄芪多糖调控 TGF- β /Smad 信号通路及上皮间充质转化抑制结肠癌肝转移 [J]. 中草药, 2025, 56(8): 2861-2868.
- [8] 徐静鸽, 武佳慧, 李星怡, 等. 黄芪甲苷通过调控 TPL2-CTGF 信号通路抑制小鼠肾缺血再灌注损伤诱导的肾纤维化 [J]. 中草药, 2025, 56(14): 5049-5060.
- [9] 余润宇, 赵文昌, 杨芷胭, 等. 毛蕊异黄酮抗炎作用研究进展 [J]. 中草药, 2025, 56(6): 2238-2248.
- [10] Bai C M, Liu J R, Zhang X M, et al. Research status and challenges of plant-derived exosome-like nanoparticles [J]. *Biomed Pharmacother*, 2024, 174: 116543.
- [11] Lian M Q, Chng W H, Liang J, et al. Plant-derived extracellular vesicles: Recent advancements and current challenges on their use for biomedical applications [J]. *J Extracell Vesicles*, 2022, 11(12): 12283.
- [12] 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.
- [13] Li X Y, Liang Z, Du J C, et al. Herbal decoctosome is a novel form of medicine [J]. *Sci China Life Sci*, 2019, 62(3): 333-348.
- [14] Cao M, Yan H J, Han X, et al. *Ginseng*-derived nanoparticles alter macrophage polarization to inhibit melanoma growth [J]. *J Immunotherapy Cancer*, 2019, 7: 326.
- [15] 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.
- [16] Zhuang X Y, Deng Z B, Mu J Y, et al. *Ginger*-derived nanoparticles protect against alcohol-induced liver damage [J]. *J Extracell Vesicles*, 2015, 4(1): 28713.

- [17] 王智槟, 杨仁义, 张婧婷, 等. 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 [J]. 中草药, 2024, 55(19): 6622-6635.
- [18] Woith E, Melzig M F. Extracellular vesicles from fresh and dried plants: Simultaneous purification and visualization using gel electrophoresis [J]. *Int J Mol Sci*, 2019, 20(2): 357.
- [19] Ambrosone A, Barbulova A, Cappetta E, *et al.* Plant extracellular vesicles: Current landscape and future directions [J]. *Plants*, 2023, 12(24): 4141.
- [20] 高文静, 侯敏, 陈潇潇, 等. 黄芪囊泡样纳米颗粒通过调节肠道菌群降低 db/db 糖尿病小鼠血糖的作用机制分析 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2021, 27(14): 111-118.
- [21] 李万敏, 裴帅龙, 李勋章, 等. 远志外泌体样纳米颗粒的分离与成分鉴定 [J]. 辽宁中医药大学学报, 2023, 25(5): 47-52.
- [22] 梁崇豹, 曾元宁, 沈志滨, 等. 醋炙对柴胡外泌体表征的影响 [J]. 时珍国医国药, 2024, 35(6): 1398-1401.
- [23] Zhang J Y, Tian S, Guo L, *et al.* Chinese herbal medicine-derived extracellular vesicles as novel biotherapeutic tools: Present and future [J]. *J Transl Med*, 2024, 22(1): 1059.
- [24] Yuan Y, Gao W J, Gao Y X, *et al.* *Astragali Radix* vesicle-like nanoparticles improve energy metabolism disorders by repairing the intestinal mucosal barrier and regulating amino acid metabolism in sleep-deprived mice [J]. *J Nanobiotechnol*, 2024, 22(1): 768.
- [25] 李青, 李博, 陈政升, 等. 团体标准《人多能干细胞来源的小细胞外囊泡》与《人间充质干细胞来源的小细胞外囊泡》解读 [J]. 中国研究型医院, 2023, 10(3): 47-50.
- [26] 高文静, 侯敏, 王攀, 等. 外泌体作为中药新活性成分的研究进展 [J]. 世界科学技术—中医药现代化, 2019, 21(9): 1869-1876.
- [27] Li Z F, Wang H Z, Yin H R, *et al.* Arrowtail RNA for ligand display on ginger exosome-like nanovesicles to systemic deliver siRNA for cancer suppression [J]. *Sci Rep*, 2018, 8: 14644.
- [28] Zeng L P, Wang H Y, Shi W H, *et al.* *Aloe* derived nanovesicle as a functional carrier for indocyanine green encapsulation and phototherapy [J]. *J Nanobiotechnol*, 2021, 19(1): 439.
- [29] 李小玲, 杜源中, 周引梅, 等. 中药及炮制品囊泡的提取技术、表征方法及应用研究进展 [J]. 中草药, 2025, 56(19): 6927-6933.
- [30] Karamanidou T, Tsouknidas A. Plant-derived extracellular vesicles as therapeutic nanocarriers [J]. *Int J Mol Sci*, 2022, 23(1): 191.
- [31] 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.
- [32] Kim K, Park J, Sohn Y, *et al.* Stability of plant leaf-derived extracellular vesicles according to preservative and storage temperature [J]. *Pharmaceutics*, 2022, 14(2): 457.
- [33] Matsuura Y, Takehira M, Joti Y, *et al.* Thermodynamics of protein denaturation at temperatures over 100 °C: CutA1 mutant proteins substituted with hydrophobic and charged residues [J]. *Sci Rep*, 2015, 5: 15545.
- [34] Xie W Y, Melzig M F. The stability of medicinal plant microRNAs in the herb preparation process [J]. *Molecules*, 2018, 23(4): 919.
- [35] Winter J, Diederichs S. Argonaute proteins regulate microRNA stability: Increased microRNA abundance by *Argonaute* proteins is due to microRNA stabilization [J]. *RNA Biol*, 2011, 8(6): 1149-1157.
- [36] Zhao Y Y, Mo B X, Chen X M. Mechanisms that impact microRNA stability in plants [J]. *RNA Biol*, 2012, 9(10): 1218-1223.
- [37] Beltrami C, Clayton A, Newbury L, *et al.* Stabilization of urinary microRNAs by association with exosomes and argonaute 2 protein [J]. *NcRNA*, 2015, 1(2): 151-166.
- [38] Wolter J M, Kotagama K, Pierre-Bez A C, *et al.* 3' Life: A functional assay to detect miRNA targets in high-throughput [J]. *Nucleic Acids Res*, 2014, 42(17): e132.
- [39] 王文娟, 何枝华, 陈艳琳, 等. 两种提取人参水煎液 miRNA 方法的比较 [J]. 广东药科大学学报, 2017, 33(5): 595-599.
- [40] Chin A R, Fong M Y, Somlo G, *et al.* Cross-kingdom inhibition of breast cancer growth by plant miR159 [J]. *Cell Res*, 2016, 26(2): 217-228.
- [41] 沈朝斌, 蔡红, 郁兰. 黄芪饮片 miRNA 谱及热力学的稳定性研究 [J]. 中草药, 2015, 46(20): 3079-3085.
- [42] Zhu H Z, Liu M Y, Wang Z M, *et al.* Self-assembly of plant-derived bioactive nanostructures in traditional Chinese medicine [J]. *iScience*, 2026, 29(2): 114667.
- [43] 胡静雯, 贾国香, 董亚倩, 等. 从中药全过程视角探析纳米颗粒自组装行为及应用 [J]. 中草药, 2022, 53(22): 7307-7316.
- [44] Cai Q, Qiao L L, Wang M, *et al.* Plants send small RNAs in extracellular vesicles to fungal pathogen to silence virulence genes [J]. *Science*, 2018, 360(6393): 1126-1129.
- [45] Liu Y L, Tao S M, Zhang Z W, *et al.* *Perilla frutescens* leaf-derived extracellular vesicle-like particles carry pab-miR-396a-5p to alleviate psoriasis by modulating IL-17 signaling [J]. *Research*, 2025, 8: 675.
- [46] Bai Y, Nan Y Y, Wu T, *et al.* Lipid nanoparticle-mediated

- delivery of CRISPR-Cas9 against *Rubicon* ameliorates NAFLD by modulating CD36 along with glycerophospholipid metabolism [J]. *Adv Sci*, 2024, 11(31): 2400493.
- [47] Qian X H, Hai W X, Chen S Y, *et al.* Multi-omics data reveals aberrant gut microbiota-host glycerophospholipid metabolism in association with neuroinflammation in APP/PS1 mice [J]. *Gut Microbes*, 2023, 15(2): 2282790.
- [48] 丁棋柯, 戴玮, 吴媛媛, 等. 黄芪甲苷抗实验性非酒精性脂肪肝病的研究进展 [J]. *中成药*, 2021, 43(8): 2135-2141.
- [49] 王哲, 马定财, 王毛毛, 等. 黄芪及其活性成分防治阿尔茨海默病机制研究进展 [J]. *中草药*, 2024, 55(6): 2094-2100.
- [50] Zhang C, Liu J, Xu D D, *et al.* Gain-of-function mutant p53 in cancer progression and therapy [J]. *J Mol Cell Biol*, 2020, 12(9): 674-687.
- [51] Yin L, Zhang H L, Shang Y H, *et al.* ErbB/HER family in cancer immunology: Therapeutic advances and mechanisms [J]. *Drug Discov Today*, 2025, 30(9): 104436.
- [52] Bahar M E, Kim H J, Kim D R. Targeting the RAS/RAF/MAPK pathway for cancer therapy: From mechanism to clinical studies [J]. *Signal Transduct Target Ther*, 2023, 8: 455.
- [53] Qi B, Wang Y Q, Zhu X, *et al.* miR-301a-mediated crosstalk between the Hedgehog and HIPPO/YAP signaling pathways promotes pancreatic cancer [J]. *Cancer Biol Ther*, 2025, 26(1): 2457761.
- [54] 郭佳鑫, 陈富财, 史亚博, 等. 中草药细胞外囊泡调控肿瘤免疫抑制微环境在癌症治疗中的研究进展 [J]. *中草药*, 2025, 56(19): 6875-6885.
- [55] Yan G, Xiao Q Y, Zhao J Y, *et al.* *Brucea javanica* derived exosome-like nanovesicles deliver miRNAs for cancer therapy [J]. *J Control Release*, 2024, 367: 425-440.

[责任编辑 郑礼胜]