铁皮石斛花外泌体样纳米颗粒的制备及体外抗肿瘤作用

肖吕浪[1, 2, 3]，王江英[1]，张芳瑕[1, 2, 3]，余梦竹[1, 2, 3]，周　英[1, 2]，朱　月[1, 2, 3]，汪祖华[1, 2, 3*]

1. 贵州中医药大学药学院，贵州 贵阳　550025
2. 贵州省现代中药创制全省重点实验室，贵州 贵阳　550025
3. 中药制剂与大健康产品开发贵州省科技创新领军人才工作站，贵州 贵阳　550025

摘　要：目的　从铁皮石斛 *Dendrobium officinale* 花中分离制备细胞外泌体样纳米颗粒（extracellular vesicle-like nanoparticles from *D. officinale* flowers，DF-EVLPs），并评估其对结肠癌细胞的特异性靶向能力，同时考察其对结肠癌细胞的体外靶向与抗肿瘤作用，为开发基于药食同源植物的靶向递送系统提供实验依据。**方法**　从铁皮石斛花中分离提取 DF-EVLPs，并对其形态和粒径进行表征。利用 pKH26 荧光标记观察 DF-EVLPs 被小鼠结肠癌 CT26 细胞的摄取情况；通过 CCK-8 法、划痕愈合实验和流式细胞术及 Western blotting 实验分别评估 DF-EVLPs 对 CT26 细胞增殖、迁移及凋亡的影响及其机制作用。**结果**　所获得的 DF-EVLPs 呈均一的杯状形态，平均粒径为（156.9±7.2）nm。细胞摄取实验显示，DF-EVLPs 能够被 CT26 细胞高效内化，且对 CT26 细胞的摄取效率显著高于正常结肠上皮细胞，表明其具有良好的特异性靶向能力。体外功能实验显示，DF-EVLPs 以浓度相关方式抑制 CT26 细胞增殖，显著降低细胞迁移能力，并诱导细胞凋亡。**结论**　成功制备了铁皮石斛花来源的外泌体样纳米颗粒，DF-EVLPs 作为一种新型食品来源纳米治疗剂，能够靶向结肠癌细胞并发挥体外抗肿瘤活性。揭示了铁皮石斛花的一种新生物活性功能，为基于“药食同源”理念的结直肠癌膳食干预提供了实验依据。

关键词：铁皮石斛花；外泌体样纳米颗粒；结肠癌；抗肿瘤作用；靶向递送系统

中图分类号：R283.6　　**文献标志码：**A　　**文章编号：**0253 - 2670(2026)19 - 7573 - 14

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2026.19.008

Preparation and *in vitro* anti-tumor effects of extracellular vesicle-like nanoparticles from *Dendrobium officinale* flowers

XIAO Lyulang[1, 2, 3], WANG Jiangying[1], ZHANG Fangxia[1, 2, 3], YU Mengzhu[1, 2, 3], ZHOU Ying[1, 2], ZHU Yue[1, 2, 3], WANG Zuhua[1, 2, 3]

1. School of Pharmacy, Guizhou University of Chinese Medicine, Guiyang 550025, China
2. Guizhou Provincial Key Laboratory for Modern Traditional Chinese Medicine Innovation, Guiyang 550025, China
3. Guizhou Provincial Leading Talent Workstation for Traditional Chinese Medicine Formulations and Health Product Development, Guiyang 550025, China

Abstract: Objective　To isolate and prepare extracellular vesicle-like nanoparticles from Tiepishihu (*Dendrobium officinale*) flowers (DF-EVLPs), and evaluate their specific targeting ability for colon cancer cells, as well as investigate their *in vitro* targeting and anti-tumor effects against colon cancer cells, in order to provide experimental evidence for the development of targeted delivery systems based on medicinal and edible plants. **Methods**　DF-EVLPs were isolated from *D. officinale* flowers and their morphology and particle size were characterized. The uptake of DF-EVLPs by CT26 colon cancer cells was observed using pKH26 fluorescence labeling. The effects of DF-EVLPs on the proliferation, migration and apoptosis of CT26 cells and their mechanism were evaluated using CCK-8 assay, scratch wound healing experiment, flow cytometry and Western blotting. **Results**　The obtained DF-EVLPs showed a uniform cup-shaped morphology with an average particle size of (156.9 ± 7.2) nm. The cell uptake experiment demonstrated that DF-EVLPs could be efficiently internalized by CT26 colon cancer cells, and the uptake efficiency of DF-EVLPs for colon cancer cells was

收稿日期：2026-04-21

基金项目：贵州省现代中药创制全省重点实验室（黔科合平台［2025］019）；中药制剂与大健康产品开发贵州省科技创新领军人才工作站（黔科合平台 KXJZ［2025］042）；贵州中医药大学纳米药物技术研究中心（贵中医 ZX 合字［2024］070）

作者简介：肖吕浪，男，硕士研究生，研究方向为纳米创新药物制剂开发。E-mail: 17671769374@163.com

***通信作者：**汪祖华，男，博士生导师，研究方向为纳米创新药物制剂开发。E-mail: wangrui551601@163.com

significantly higher than that of normal colonic epithelial cells, indicating their good specific targeting ability. The *in vitro* functional experiments showed that DF-EVLPs inhibited the proliferation of CT26 cells in a concentration-dependent manner, significantly reduced cell migration ability, and induced cell apoptosis. **Conclusion** This study successfully prepared extracellular vesicle-like nanoparticles from *D. officinale* flowers. As a new type of food-derived nanotherapeutic agent, DF-EVLPs can specifically target colon cancer cells and exert *in vitro* anti-tumor activity. This study reveals a new biological activity function of *D. officinale* flowers and provides experimental evidence for dietary intervention for colorectal cancer based on the "medicinal and edible" concept.

Key words: *Dendrobium officinale* flower; extracellular vesicle-like nanoparticles; colon cancer; anti-tumor effect; targeted delivery system

根据国际癌症研究机构发布的 GLOBOCAN 2022 数据显示，2022 年全球结直肠癌新发病例约 193 万例，死亡病例约 90.4 万例，结直肠癌仍是全球疾病负担最重的恶性肿瘤之一[1]。在中国，由于西式饮食模式的盛行和人口老龄化，结肠癌的发病率显著上升，如今已成为第 2 大常见的消化道恶性肿瘤[2]。虽然局部结肠癌通常可以通过手术切除治愈，但与此同时，身体的失衡会破坏肠道屏障的完整性，导致肠道通透性增加，并使其更容易发生远处转移[3]。对于这些临床上的晚期病例，对化疗和靶向治疗产生耐药性的情况常常导致不良预后。标准的临床治疗依赖于手术切除，随后进行辅助化疗。尽管靶向药物和免疫检查点抑制剂的引入，改善了部分患者的生存率，但它们的总体疗效受到低反应率和最终出现耐药复发的限制[4]。因此，迫切需要探索新的治疗策略。源自天然产物的多靶点干预措施是一个极具前景的研究方向，有望克服这些局限性[5]。

外泌体样纳米颗粒（extracellular vesicle-like nanoparticles，EVLPs）是一种直径在 30～150 nm 的细胞外囊泡，它们通过多囊泡体与细胞质膜的融合而产生，并且是各种生物体液（包括血液、唾液和植物汁液）中的普遍成分[3]。它们作为运输载体的实用性源于几个内在优势：由于其类似于人类细胞膜的磷脂双层结构，具有很高的生物相容性，这使得其免疫原性低，并能在体内迅速被清除[6]；其天然的跨生物屏障能力，得益于其纳米级尺寸和表面蛋白质，能够穿透诸如肿瘤等组织[7]；以及在装载货物方面的非凡灵活性，能够容纳疏水性药物、核酸（如 siRNA）和蛋白质[8]。此外，越来越多的证据表明，植物来源 EVLPs 在各种疾病模型中具有治疗潜力。例如，葡萄来源的 EVLPs 显著增强了姜黄素对肺癌 A549 细胞的稳定性和抗增殖活性[9]，而柑橘来源的载有阿霉素的 EVLPs 将其在乳腺癌 MCF-7 细胞中的半抑制浓度（half maximal inhibitory concentration，IC_{50}）降低到了游离药物的五分之一[10]。在肿瘤学领域之外，植物来源 EVLPs 在抗炎和组织再生方面也显示出疗效，突显了其作为天然纳米治疗药物的多功能性。然而，源自可食用药用植物的 EVLPs 在结肠癌治疗中的应用仍基本未被探索，需要对其成分特征和精确作用机制进行系统分析。

铁皮石斛 *Dendrobium officinale* Kimura & Migo 是兰科石斛属植物，是传统中医中“药食同源”类别下的著名药用植物。其干燥茎干因其用于滋阴和补胃而备受推崇[11]，而其花朵最近则成为科学研究的关注焦点。铁皮石斛的花朵富含多种生物活性化合物，包括多糖、黄酮类化合物以及二苯基苄基化合物[12]，因其潜在的治疗价值而备受研究关注。例如，一种特定的多糖成分铁皮石斛多糖-1（*D. officinale* polysaccharide-1，DOP-1），由甘露糖、葡萄糖和半乳糖组成，已被证明能够激活 Toll 样受体 4（Toll-like receptor 4，TLR4）/核因子-κB（nuclear factor-κB，NF-κB）通路，增强巨噬细胞的吞噬作用，并提高血清中白细胞介素-2（interleukin-2，IL-2）和 γ 干扰素（interferon-γ，IFN-γ）的水平[13]。至关重要的是，铁皮石斛提取物通过多种机制展现出直接的抗肿瘤效果。体外研究表明，它们通过上调 Bcl-2 相关 X 蛋白（Bcl-2 associated X protein，Bax）/B 淋巴细胞瘤-2（B-cell lymphoma-2，Bcl-2）比例和激活半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-3（cysteine-aspartic protease-3，Caspase-3）来诱导结肠癌 SW480 细胞的线粒体依赖性凋亡[14]，并通过下调基质金属蛋白酶-9（matrix metalloproteinase-9，MMP-9）表达和阻断转化生长因子-β（transforming growth factor-β，TGF-β）介导的上皮间质转化来抑制人结肠癌 HCT116 细胞的迁移[15]。此外，一项体内研究报道称，铁皮石斛提取物能够增强自然杀伤（natural killer，NK）细胞的细胞毒性，并与化疗药物 5-氟尿嘧啶（5-fluorouracil，5-FU）协同作用，以抑制小鼠

结肠癌 CT26 肿瘤的生长[16]。鉴于其与 5-FU 的协同作用及其多靶点的抗癌活性，铁皮石斛花作为一种有前景的食用和药用植物资源，为开发新型辅助疗法提供了可能。

鉴于这种潜力，从铁皮石斛花中分离并鉴定了其中的外泌体样纳米颗粒（extracellular vesicle-like nanoparticles from *D. officinale* flowers，DF-EVLPs），本研究对其基本理化性质进行了表征，并通过细胞摄取、细胞增殖、迁移和凋亡等体外实验，初步评价其对结肠癌细胞的靶向性及抗肿瘤活性。同时，采用 Western blotting 法检测凋亡相关蛋白的表达变化，初步探讨其可能的作用机制。本研究为进一步评价植物来源 EVLPs 的抗肿瘤活性及铁皮石斛花资源的开发利用提供了实验依据。

1 仪器与材料

1.1 仪器

Hitachi HT7800 型 透射电子显微镜，日本日立高新技术公司；AE124/AE124C 型触屏式电子分析天平，上海舜宇恒平科学仪器有限公司；Sorvall LYNX 6000 型超高速离心机、Q Exactive Plus 组合型四极杆 Orbitrap 质谱仪、EVOS M5000 型荧光倒置显微镜、Multiskan Sky 型全波长酶标仪、Thermo 3111 型二氧化碳培养箱、Orbitrap Fusion Lumos 型三合一质谱仪、EASY-nLC™ 1200 液相色谱，赛默飞世尔科技公司；OM35R-C 型破壁机，宁波麦格威特电器有限公司；Nanosight NS300 型纳米颗粒跟踪分析仪、ZSU3100 型激光粒度仪、Zetasize Pro 型粒径仪，英国马尔文帕纳科公司；YXQ-S0S II 型立式压力蒸汽灭菌器，上海东亚压力容器制造有限公司；ZS-AE7S 型流式细胞仪，中生北控生物科技股份有限公司；伯乐 PowerPac Basic 型电泳仪，美国伯乐生命医学产品公司；Bio Spectrometer 型紫外分光光度计、Centrifuge 5430R 型离心机、Concentrator plus 型真空离心浓缩仪，德国艾本德股份公司。

1.2 材料

铁皮石斛花购自贵州省安龙县欣蔓生物科技有限公司，经贵州中医药大学药学院王志威教授鉴定为兰科（Orchidaceae）石斛属 *Dendrobium* Sw.植物铁皮石斛 *D. officinale* Kimura et Migo 的干燥花。

RPMI1640 培养基（批号 2022102601）、磷酸盐缓冲液（PBS，批号 2022030302），浙江森瑞生物科技有限公司；0.25%乙二胺四乙酸（ethylene diamine tetraacetic acid，EDTA）胰酶（批号 20201221）、二甲基亚砜（dimethyl sulfoxide，DMSO，批号 710N0312），北京索莱宝科技有限公司；无水乙醇、石蜡（批号 69019361）、二甲苯（批号 10023418），国药集团化学试剂有限公司；4′,6-二脒基-2-苯基吲哚（4′,6-diamidino-2-phenylindole，DAPI，批号 C1002）、Western 一抗稀释液（批号 P0023A）、Western 二抗稀释液（批号 P0023D）、聚山梨酯-20（批号 ST1727），上海碧云天生物技术股份有限公司；胎牛血清（批号 21020701），浙江天杭生物科技股份有限公司；快速银染试剂盒（批号 P0017S），碧云天生物科技有限公司；PKH26（批号 12352207），美国 Sigma-Aldrich 公司；Bax 抗体（批号 CL488-50599）；Bcl-2 抗体（批号 12789-1-AP）、Caspase-3 抗体（批号 CASP3）、cleaved Caspase-3 抗体（批号 82707-13-RR）、β-actin 抗体（批号 CL488-20536）、二抗（批号 RGAR001），武汉三鹰生物技术有限公司；0.22 μm PVDF 膜（批号 GVHP04700）、甲醇（批号 1.06018.1000）、乙腈（批号 1.00030），默克密理博公司；C_{18} 上样柱（批号 89870/89873），美国 Thermo Scientific 公司；C_{18} 分析柱、蛋白 Marker（批号 26619）、曲拉通 X-100，赛默飞世尔科技公司。人非小细胞肺癌细胞 A549 细胞、小鼠结肠癌细胞 CT26 细胞、人肝癌细胞 HepG2 细胞、人胃癌细胞 SGC7091 细胞和人正常结肠上皮细胞 NCM460 细胞，均来源于浙江大学药学院，采用含有 10%胎牛血清（fetal bovine serum，FBS）、青霉素 100 U/mL、链霉素 100 mg/mL 的 RPMI1640 培养基，细胞培养箱条件为 37 ℃、5% CO_2。

2 方法与结果

2.1 DF-EVLPs 的制备及理化表征

2.1.1 DF-EVLPs 的提取 按照本实验室之前的提取方式[17]，采用超速离心法分离铁皮石斛花中的 DF-EVLPs。称取 500 g 铁皮石斛鲜花，室温（25 ℃）下洗净表面污渍后去离子水润洗 2～3 次。将洗净后的铁皮石斛鲜花置于破壁机内，进行榨汁提取。将渣和汁液转移至 50 mL 离心管内，4 000×*g*、4 ℃离心 60 min 除去残渣，取上清；10 000×*g*、4 ℃离心 60 min 除去细胞碎片和细胞器。将上清液使用超高速离心机 100 000×*g*、4 ℃离心 90 min，弃去上清收集沉淀；沉淀重悬于 1×PBS 中，100 000×*g*、4 ℃离心 90 min。将得到的沉淀用 1 mL 1×PBS 重悬后得到 EVLPs，提取流程如图 1 所示。

2.1.2 DF-EVLPs 的粒径分析 采用纳米颗粒跟踪

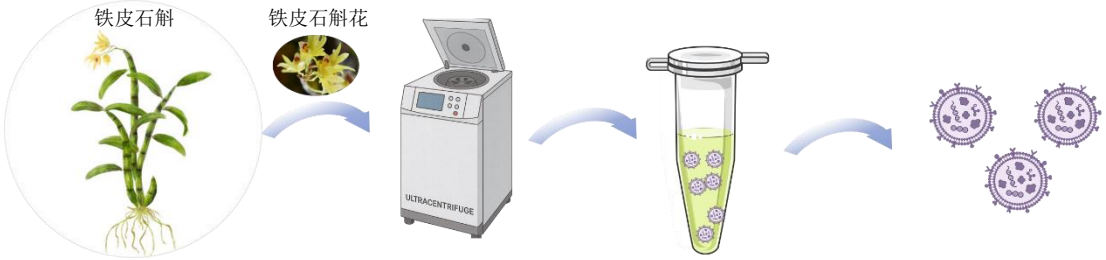


图 1　DF-EVLPs 提取流程

Fig. 1　Flowchart for DF-EVLPs extraction

分析（nanoparticle tracking analysis，NTA）技术检测 DF-EVLPs 的颗粒分布和浓度。取 10 μL 分离纯化后的囊泡样品 DF-EVLPs 用 PBS 稀释至 1×10^8～1×10^9 颗粒/mL，25 ℃下使用波长 405 nm 的激光源照射 EVLPs 混悬液，观察并记录 DF-EVLPs 颗粒实时动态影像。结果如图 2 所示，DF-EVLPs 的粒径为（156.9±7.2）nm，符合 EVLPs 的大小分布，颗粒浓度为 4.48×10^{10} 颗粒/mL。

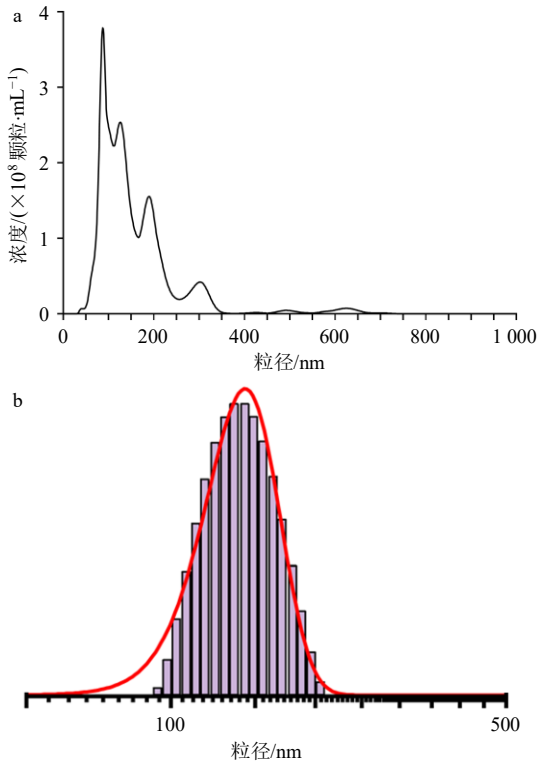


图 2　DF-EVLPs 的 NTA 结果（a）及粒径分布（b）

Fig. 2　NTA results (a) and particle size distribution (b) for DF-EVLPs

2.1.3　DF-EVLPs 的微观形貌　采用透射电子显微镜（transmission electron microscope，TEM）观察 DF-EVLPs 微观形貌。将 10 μL DF-EVLPs 用 PBS 稀释至 10 mL，通过 0.45 μm 微孔滤膜，并取 100 μL 沉积在铜网上，用 2.5%戊二醛和 1%鞣酸固定 2 h，风干，溅射镀金，并在 TEM 下观察并拍摄图像。结果如图 3 所示，DF-EVLPS 的粒径约为 160 nm，与“2.1.2”项下 NTA 结果基本一致。EVLPs 呈现出茶托样的圆形或类圆形，囊泡边缘具有明亮的亮圈，内部较暗，具有明显膜性结构，特征与典型的 EVLPs 形态一致，证明本研究成功地从铁皮石斛花中提取分离出 EVLPs。

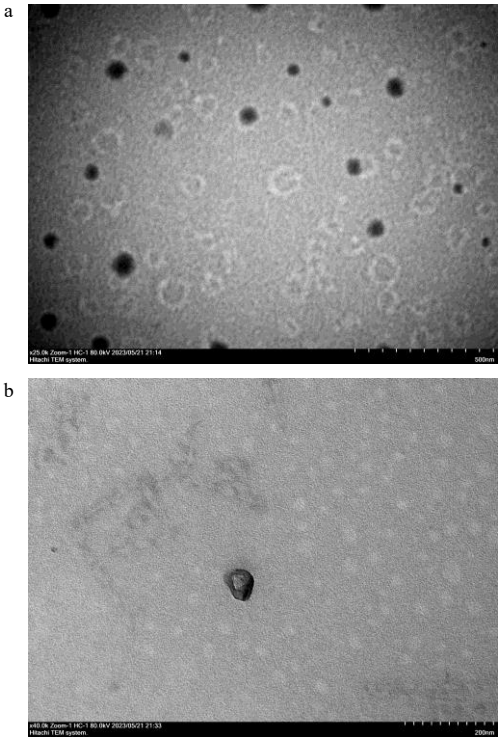


图 3　不同倍率（×25 000, a; ×40 000, b）下 DF-EVLPs 的 TEM 图

Fig. 3　TEM images of DF-EVLPs at different magnifications (× 25 000, a; × 40 000, b)

2.1.4　DF-EVLPs 的蛋白组成初步分析　使用 BCA 蛋白定量分析试剂盒测定外泌体的蛋白浓度。将 BSA 梯度稀释配制不同浓度的蛋白标准品，绘制标准曲线 $Y=0.258\,3\,X-0.274\,6$，$R^2=0.990\,86$；根据样品量将 BCA 试剂 A 和 BCA 试剂 B 按 49∶1 的

比例配制成蛋白工作液；吸取适量的待测样品加入到 96 孔板中，加入完成后，再向加有样品的孔中每孔加入对应量的工作液，恒温孵育箱中 37 ℃孵育 30 min；孵育结束后，于酶标仪 562 nm 波长下检测吸光度（*A*）。最终测得 DF-EVLPs 中蛋白质量浓度为（0.48±0.17）mg/mL。

此外，外泌体中包含各种蛋白质以起到物质运输或激发受体细胞功能等作用，使用银染检测 DF-EVLPs 的蛋白质成分。取 200 μL DF-EVLPs 样品，加入 50 μL 上样缓冲液（5×Loading Buffer）95 ℃煮沸变性 10 min，得到蛋白样品在 12% SDS-PAGE 凝胶上进行蛋白质凝胶电泳。电泳结束后，使用快速银染试剂盒进行染色，直到出现清晰的条带终止染色，拍照进行分析。发现在相对分子质量 1.50×10^5 以下等多个位置处存在明显条带，结果如图 4 所示，说明提取出的 DF-EVLPs 含有多种不同相对分子质量的蛋白质。

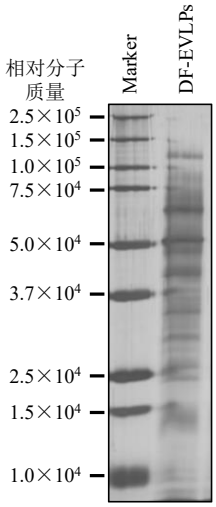


图 4　DF-EVLPs 的 SDS-PAGE 电泳凝胶图

Fig. 4　SDS-PAGE gel electrophoresis diagram of DF-EVLPs

2.1.5　DF-EVLPs 的稳定性分析　按照“2.1.1”项中的步骤，提取 3 批独立制备的 DF-EVLPs 样品各 50 μL，用 1×PBS（pH 7.4）稀释至 1 mL，轻轻颠倒混匀。取稀释后样品约 1 mL 注入一次性聚苯乙烯粒径样品池（DTS0012），避免产生气泡。采用动态光散射技术进行测量。

同样地，取 3 批独立制备的 DF-EVLPs 样品各 50 μL，用去离子水稀释至 1 mL，使用一次性 ζ 电位样品池（DTS1070），采用电泳光散射和相位分析光散射技术测量其 ζ 电位。

DF-EVLPs 之间的批次稳定性结果如图 5 所示，

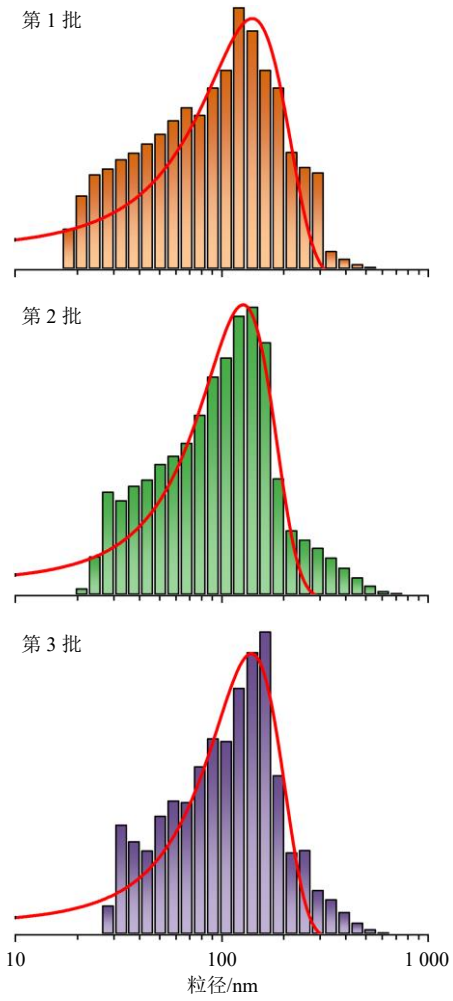


图 5　DF-EVLPs 的提取稳定性结果

Fig. 5　Results of extraction stability of DF-EVLPs

3 批次提取出的 DF-EVLPs 粒径分别为（141.70±4.20）、（128.10±2.49）、（140.30±2.84）nm（n=3），与“2.1.2”项下 NTA 检测出的粒径接近，均在 EVLPs 的粒径范围内（30～150 nm），且 ζ 电位值分别为（−25.136±2.387）、（−27.393±3.386）、（−24.503±3.901）mV（n=3），表明 DF-EVLPs 表面携带一定密度的负电荷，颗粒间静电斥力足以维持制剂的胶体稳定性，可有效防止储存或使用过程中的聚集沉淀。以上结果证实，采用超速离心法制备的 DF-EVLPs 具有良好且可控的批次间一致性和分散稳定性，为其后续体外功能研究和潜在应用提供了可靠的质量保障。

2.2　DF-EVLPs 的血液相容性研究

溶血实验是对生物材料毒性作用的重要初步评估，溶血率＞5%表示该物质导致红细胞损伤。利用大鼠红细胞溶血实验来考察 DF-EVLPs 的血液相容性。

大鼠腹主动脉取血后在 4 ℃条件下 2 000 r/min 离心 15 min（离心半径 10 cm），小心吸取弃去上层血清，加入适量 PBS 清洗下层红细胞并再次离心，清洗至上清液呈无色为止。精密移取 800 μL 红细胞，置于 50 mL 离心管中，加入 40 mL PBS，轻轻摇晃混匀，得到 2%红细胞悬液。

用 PBS 将 DF-EVLPs 稀释至不同浓度，并各取 0.5 mL 置于 2 mL EP 管中，分别加入 0.5 mL 2%红细胞悬液，混匀。将 EP 管在 37 ℃、100 r/min 摇动 30 min，然后以 2 000 r/min 离心 15 min。收集每组样品的上清液，检测 540 nm 波长下的 *A* 值。PBS 作为阴性对照组，曲拉通 X-100 作为阳性对照组，用 PBS、曲拉通 X-100 和不同颗粒浓度 DF-EVLPs 处理的大鼠红细胞的溶血结果（图 6 和表 1）显示，不同颗粒浓度 DF-EVLPs 之间的溶血率均小于 2%。该结果表明 DF-EVLPs 具有良好的血液相容性。

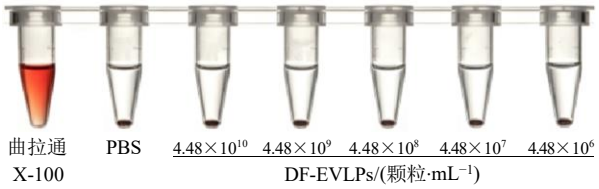


图 6　DF-EVLPs 血液相容性结果

Fig. 6　Blood compatibility results of DF-EVLPs

表 1　不同颗粒浓度 DF-EVLPs 血液相容性（$\bar{x} \pm s$，$n = 3$）

Table 1　Blood compatibility of DF-EVLPs with different particle concentrations ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

组别	颗粒浓度/(颗粒·mL^{-1})	溶血率/%
曲拉通X-100	−	100.00±1.23
PBS	−	0.16±0.12
DF-EVLPs	4.48×10^{10}	4.17±0.17
	4.48×10^{9}	0.61±0.12
	4.48×10^{8}	0.23±0.01
	4.48×10^{7}	0.78±0.45
	4.48×10^{6}	0.24±0.19

2.3　DF-EVLPs 对不同肿瘤细胞的细胞毒性检测

取对数生长期 A549、CT26、HepG2 和 SGC7091 细胞，以每孔 5.0×10^4 个细胞密度接种于 96 孔板内，37 ℃、5% CO_2 孵育箱中培养过夜。小心除去培养基上清，分别加入含有不同颗粒浓度的 DF-EVLPs RPMI1640 培养基 100 μL，37 ℃孵育 24 h，未作处理的细胞作为对照，只加培养基不加细胞作为空白。小心除去培养基上清，而后每孔加入含有 10% CCK-8 的不完全培养基 100 μL，37 ℃继续孵育 4 h，酶标仪检测 450 nm 处 *A* 值，计算细胞存活率。结果（表 2）发现，DF-EVLPs 对 CT26 细胞有较强的毒性且存在一定的浓度相关性。

表 2　DF-EVLPs 对不同肿瘤细胞的细胞毒性（$\bar{x} \pm s$，$n = 3$）

Table 2　Cytotoxicity of DF-EVLPs against different tumor cells ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

组别	颗粒浓度/(颗粒·mL^{-1})	细胞存活率/%			
		A549	CT26	HepG2	SGC7091
对照	−	101.29±1.96	101.26±2.42	99.74±2.32	101.78±3.14
DF-EVLPs	4.48×10^{7}	104.44±1.02	92.80±2.05***	87.04±3.81	92.65±3.21*
	4.48×10^{8}	99.79±1.51	64.57±2.91***	68.64±6.81$^{**\#\#}$	87.83±3.08
	4.48×10^{9}	104.44±1.02$^{\#}$	27.11±4.13$^{***\#\#\#}$	65.68±1.31$^{**\#\#}$	85.72±1.04***

与对照组比较：$^{*}P<0.05$　$^{**}P<0.01$　$^{***}P<0.001$；与 DF-EVLPs 4.48×10^7 颗粒/mL 组比较：$^{\#}P<0.05$　$^{\#\#}P<0.01$　$^{\#\#\#}P<0.001$。

$^{*}P<0.05$　$^{**}P<0.01$　$^{***}P<0.001$ *vs* control group; $^{\#}P<0.05$　$^{\#\#}P<0.01$ $^{\#\#\#}P<0.001$ *vs* DF-EVLPs 4.48×10^7 particles/mL group.

细胞存活率＝($A_{实验}-A_{空白}$)/($A_{对照}-A_{空白}$)

2.4　DF-EVLPs 体外抗结肠癌活性及其机制研究

2.4.1　细胞摄取实验　EVLPs 的活性成分主要在细胞内发挥生物学功能，因此，肿瘤细胞对 EVLPs 的摄取作用至关重要。由于 DF-EVLPs 外包裹有磷脂，因此，选用亲脂性染料 pKH26 标记 DF-EVLPs，采用倒置荧光显微镜观察 CT26 细胞对 pKH26/DF-EVLPs 的摄取情况。首先，取 1 mL DF-EVLPs 样品加入 pKH26 荧光染料，使之终浓度为 5 μmol/L，37 ℃避光孵育 30 min，37 ℃继续孵育 4 h，转移至截留相对分子质量 3 000 超滤管中，4 ℃、5 000×*g* 离心 30 min 至无液体滤出，以除去游离染料，收集 pKH26/DF-EVLPs，4 ℃避光保存[18]。取对数生长期 CT26 细胞，以每孔 3×10^4 细胞密度接种于 24 孔板内，37 ℃、5% CO_2 孵育箱中培养过夜。小心除去培养基上清，按照时间梯度（24、12、6、3、0 h）加入 pKH26/DF-EVLPs，孵育结束后 PBS 洗涤 2 次以除去残留血清和游离药物的干扰，加入 DAPI 染料后孵箱避光孵育 10 min，PBS 洗涤 2 次，倒置荧光显微镜观察并拍照。结果如图 7 所示，红色荧光代表 pKH26/DF-EVLPs，荧光强度越强即细胞摄取的药物量越多。从荧光强度上分析，CT26 细胞对

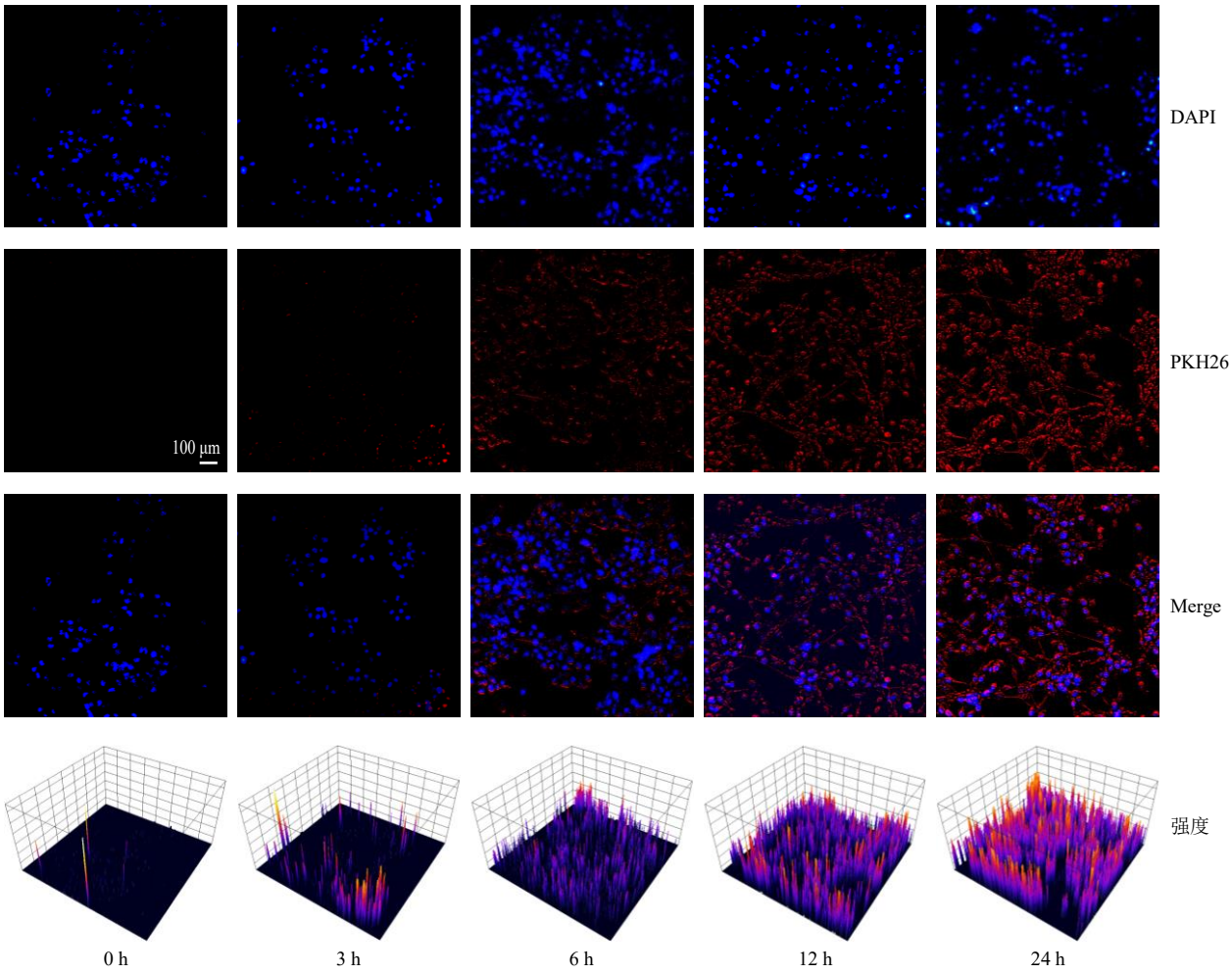


图 7　CT26 细胞经时摄取 DF-EVLPs

Fig. 7　Uptake of DF-EVLPs in CT26 cells

pKH26/DF-EVLPs 的摄取呈现时间相关性。

2.4.2　细胞毒性检测　采用 CCK-8 法检测不同颗粒浓度 DF-EVLPs 对 CT26 细胞和 NCM460 细胞毒性。取对数生长期 CT26 细胞和 NCM460 细胞，分别以每孔 1×10^4 个细胞密度接种于 96 孔板内，37 ℃、5% CO_2 孵育箱中培养过夜。小心除去培养基上清，加入 DF-EVLPs RPMI1640 培养基 100 μL，未经药物处理的细胞作为对照，不含细胞的作为空白组，37 ℃孵育 24 h。小心弃去培养基，每孔加入含有 10% CCK-8 的不完全培养基 100 μL，37 ℃继续孵育 4 h，酶标仪检测 450 nm 处 *A* 值，按照“2.3”项下公式计算细胞存活率。结果（表 3）发现，随着 DF-EVLPs 的稀释倍数增加，对 CT26 细胞毒性逐渐降低，DF-EVLPs 对 CT26 细胞的抑制具有浓度相关性。而对于 NCM460 细胞，DF-EVLPs 浓度的增加并未影响其存活率，其细胞活性均在 80%以上，这表明 DF-EVLPs 能够特异性抑制结肠癌 CT26 细胞生长，而不影响到正常细胞，说明 DF-EVLPs 具有显著的抗结肠癌活性，且具有良好的生物安全性。

表 3　不同颗粒浓度 DF-EVLPs 对 CT26 细胞和 NCM460 细胞的细胞毒性（$\bar{x}\pm s$, $n=3$）

Table 3　Effects of different concentrations of DF-EVLPs on viability of NCM460 and CT26 cells ($\bar{x}\pm s$, $n=3$)

组别	稀释倍数	细胞存活率/%	
		NCM460	CT26
对照	−	100.00±1.70	99.99±5.15
DF-EVLPs	10	100.86±0.85	14.46±3.76
	20	99.86±0.24	15.18±7.31
	40	101.14±0.96	17.03±0.82
	60	100.94±0.32	22.19±2.34
	80	101.90±0.94	36.49±1.42
	100	99.46±1.08	44.79±0.90
	1 000	101.41±1.55	102.01±4.38

2.4.3　活/死细胞染色　采用 Live&Dead 细胞染色法评价 DF-EVLPs 体外抗结肠癌活性。Calcein-AM

和 PI 可分别检测细胞内酯酶活性和细胞膜完整性，从而反映细胞活性和细胞毒性。其中 Calcein-AM 染色活细胞，在胞内酯酶的作用下转化为绿色荧光物质呈现亮绿色荧光，而碘化丙啶（propidium iodide，PI）能够染色膜破损的死细胞，呈现红色荧光。因此取对数生长期 CT26 细胞，以每孔 1×10^4 个细胞密度接种于 96 孔板内，37 ℃、5% CO_2 孵育箱中培养过夜。小心除去培养基上清，加入 DF-EVLPs RPMI 1640（给药浓度为 4.48×10^9 颗粒/mL）培养基 100 μL，37 ℃孵育 24 h，未作处理的细胞作为对照。小心除去培养基上清，PBS 洗涤 2 次，加入 Calcein-AM 和 PI 染料，37 ℃避光孵育 30 min，PBS 洗涤 2 次，置于倒置荧光显微镜下观察并拍照。结果（图 8 和表 4）发现对照组（即未经药物处理组）少见红色荧光，而经 DF-EVLPs 处理后的 CT26 细胞可见大量红色荧光分布，绿色荧光少于对照组。这表明经 DF-EVLPs 作用后，可特异性杀死肿瘤细胞，证明 DF-EVLPs 有良好的抗结肠癌效果。

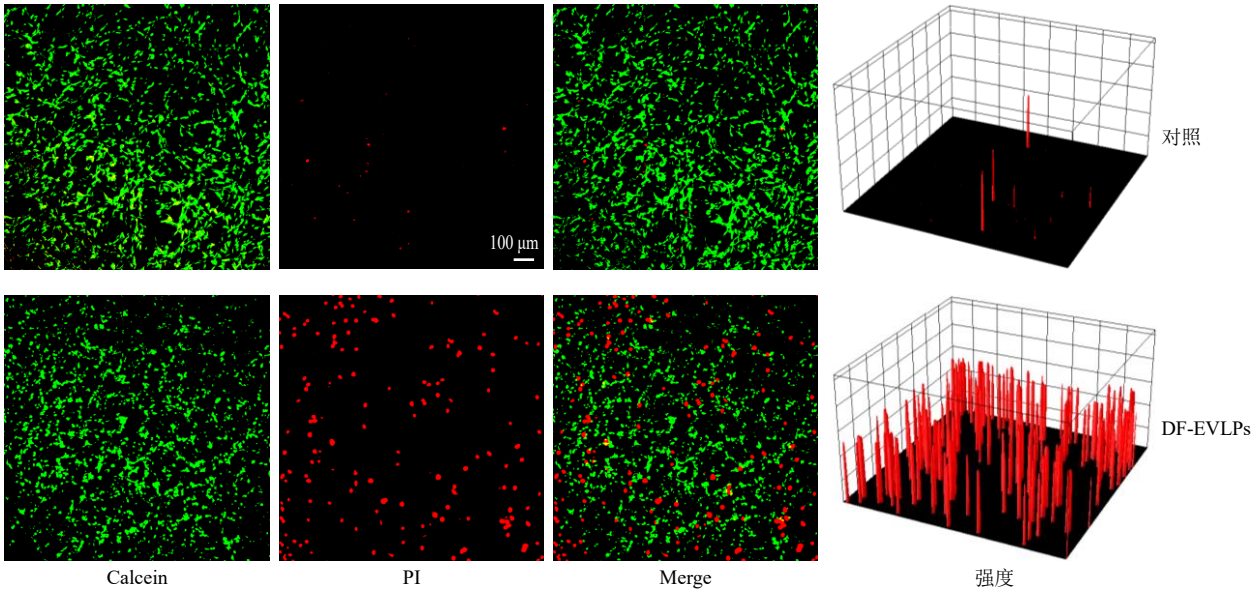


图 8　经 DF-EVLPs 处理的 CT26 细胞活/死细胞染色图像

Fig. 8　Live/dead images of CT26 cells treated with DF-EVLPs

表 4　经 DF-EVLPs 处理的 CT26 细胞 Live&Dead 图像相对荧光强度统计（$\bar{x}\pm s$，$n=3$）

Table 4　Live/dead images of CT26 cells treated with DF-EVLPs ($\bar{x}\pm s$, $n=3$)

组别	颗粒浓度/(颗粒·mL^{-1})	相对荧光强度/%
对照	−	9.57±8.41
DF-EVLPs	4.48×10^9	86.90±4.80

2.4.4　细胞划痕实验　细胞划痕实验常用于评估细胞的迁移能力，观察细胞随时间迁移覆盖划痕区域的情况，因此，采用划痕实验检测肿瘤细胞的侵袭和迁移情况。取对数生长期 CT26 细胞，以每孔 1×10^5 个细胞密度接种于 6 孔板内，37 ℃、5% CO_2 孵育箱中培养过夜。当细胞密度达到 90%～100%时，小心除去培养基上清，使用 200 μL 无菌移液枪枪头垂直于孔板底部划线，呈现出“一”字划痕的形状，PBS 清洗 2 次以除去脱落细胞和细胞碎片。加入 DF-EVLPs RPMI1640（给药浓度为 4.48×10^9 颗粒/mL）培养基继续培养，分别在给药后 0、12、24 h 后用倒置显微镜拍照，观察划痕处细胞生长迁移情况。使用 Image J 软件测量划痕面积，测量 3 次，计算细胞迁移率。

细胞迁移率＝(0 h 划痕宽度－24 h 划痕宽度)/0 h 划痕宽度

结果如图 9 和表 5 所示，对照组中细胞层迁移活跃，划痕边缘细胞伪足伸展明显，部分缝隙或创伤空间几乎被迁移的细胞占据，12、24 h 划痕迁移率分别为（22.98±9.74）%和（61.70±5.51）%。相比之下，经 DF-EVLPs 处理的 CT26 细胞由于其迁移能力显著受到抑制，未能闭合划痕，12 h 细胞迁移率仅为（18.94±3.72）%，24 h 后迁移率仍维持在（43.76±4.92）%，且划痕边缘细胞形态呈圆形，伪足形成减少。以上结果表明，DF-EVLPs 可以显著抑制 CT26 细胞的侵袭迁移能力。

2.4.5　平板克隆实验　细胞克隆形成实验常用来检

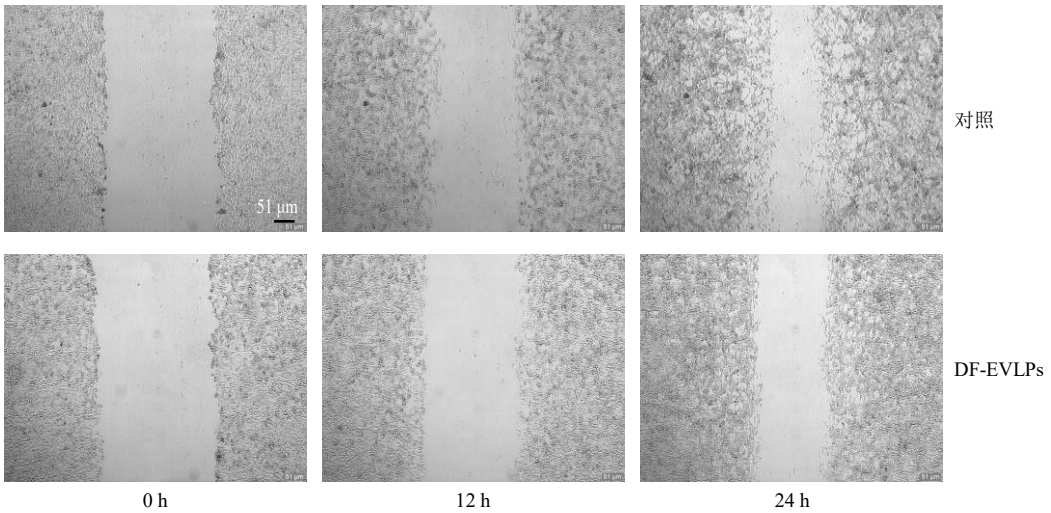


图 9　DF-EVLPs 抑制 CT26 细胞迁移效应（放大倍数 10×，标尺 51 μm）

Fig. 9　Inhibition of CT26 cell migration by DF-EVLPs (magnification 10 ×, scale bar 51 μm)

表 5　DF-EVLPs 抑制 CT26 细胞迁移的量化统计（$\bar{x} \pm s$，$n = 3$）

Table 5　Quantitative statistics of DF-EVLPs-mediated inhibition of CT26 cell migration ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

组别	颗粒浓度/(颗粒·mL^{-1})	迁移面积/μm^2			迁移率/%	
		0 h	12 h	24 h	12 h	24 h
对照	−	20.29±1.26	15.63±1.98	7.77±1.12	22.98±9.74	61.70±5.51
DF-EVLPs	4.48×10^9	21.51±0.72	17.43±0.80	12.09±1.06**	18.94±3.72	43.76±4.92*

与同时段内对照组比较：*P<0.05　**P<0.01。

*P < 0.05　**P < 0.01 *vs* control group in the same period.

测细胞增殖能力、侵袭性和对杀伤因素敏感性等。当单个细胞在体外增殖 6 代及以上，其后代所组成的细胞群体，成为集落或克隆。因此，本研究通过平板克隆实验评价 DF-EVLPs 对 CT26 细胞成瘤能力的影响。取对数生长期 CT26 细胞，胰酶消化后用完全培养基重悬成单细胞悬液，以 500 个/孔细胞接种于 6 孔板内，DF-EVLPs 用培养基调整至 1×10^9 颗粒/mL 加入 6 孔板中。37 ℃、5% CO_2 孵育箱中继续培养 14 d 至单个克隆细胞数大于 50，中途每隔 3 d 进行换液并观察细胞状态。克隆完成后，PBS 洗涤 2 次，每孔加入 4%多聚甲醛室温固定 30 min，PBS 洗涤 2 次，加入 0.1%结晶紫染色 10 min，PBS 洗涤细胞至背景干净清晰无残留染料，晾干后观察并拍照，使用 Image J 软件统计克隆数量。结果如图 10 和表 6 所示，对照组克隆形成能力较强，平均每孔形成（90±6）个克隆，克隆形态规则，边缘较清晰。而给药组克隆形成显著受到抑制，平均克隆数降至（33±5）个，且部分残留克隆细胞呈现松散碎片化，说明细胞增殖受限或凋亡增加。上述结果表明，经 DF-EVLPs 处理后，CT26 细胞的克隆形成和成瘤能力被显著抑制。

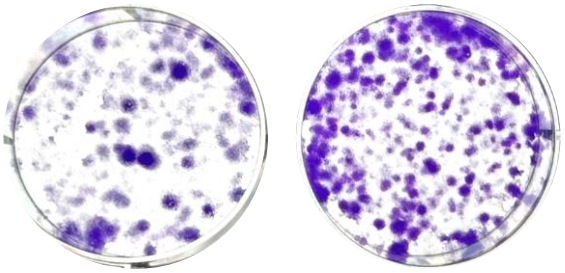


图 10　DF-EVLPs 对 CT26 细胞克隆形成的影响

Fig. 10　Effects of DF-EVLPs on CT26 cell colony formation

表 6　细胞克隆形成的定量分析（$\bar{x} \pm s$，$n = 3$）

Table 6　Quantitative analysis of cell colony formation ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

组别	颗粒浓度/(颗粒·mL^{-1})	细胞克隆数
对照	−	90±6
DF-EVLPs	4.48×10^9	33±5***

与对照组比较：***P<0.001。

***P < 0.001 *vs* control group.

2.4.6　流式细胞术检测细胞凋亡　Annexin V-FITC/PI 双染法是流式细胞术检测细胞凋亡的常用方法。Annexin V 是一种钙离子依赖性磷脂结合蛋白，与

磷脂酰丝氨酸（phosphatidylserine，PS）有高度亲和力，当细胞发生凋亡时，膜内侧的磷脂酰丝氨酸外翻到膜表面与荧光染料标记的 Annexin V 结合；凋亡末期时，细胞膜结构受损，PI 染料进入细胞中产生信号，分别检测 Annexin V-FITC/PI 信号对早期凋亡和晚期凋亡或坏死细胞的比例进行定量。

取对数生长期 CT26 细胞，以 2×10^5 个细胞密度接种于 6 孔板内，37 ℃、5% CO_2 孵育箱中培养过夜，DF-EVLPs 用培养基调整至不同浓度加入 6 孔板中，未给药细胞作为对照组，37 ℃孵育 24 h。给药结束后，弃去原培养基转移至无菌离心管中，PBS 洗涤 2 次，使用不含 EDTA 的胰酶消化，加入原培养基终止消化，缓慢吹打细胞，收集细胞悬液至离心管中，4 ℃、1 000 r/min 离心 5 min（离心半径 10 cm），弃去上清，加入 PBS 重悬细胞，4 ℃、1 000 r/min 离心 5 min，取适量细胞重悬于 100 μL 1×结合缓冲液（binding buffer）中，加入 5 μL Annexin V-FITC，室温避光孵育 15 min，加入 5 μL PI 染料，避光孵育 5 min 后立即加入 400 μL 1×结合缓冲液，混匀后流式上机检测。

以未染色细胞设置阈值，排除自身荧光干扰；FSC/SSC 散点图圈定活细胞群体，排除细胞碎片。数据分析采用 FlowJo 软件，根据 Annexin V^+/PI^-（早期凋亡）和 Annexin V^+/PI^+（晚期凋亡/坏死）比例计算总凋亡率。

结果如图 11 和表 7 所示，对照组中 Annexin V^+/PI^-细胞占比（7.6±0.8）%，Annexin V^+/PI^+占比（1.6±0.3）%，总凋亡率为（9.13±0.91）%。给药组随着颗粒浓度的增加凋亡率显著升高［4.48×10^7 颗粒/mL（11.27±0.92）%，4.48×10^8 颗粒/mL（11.57±0.90）%，4.48×10^9 颗粒/mL（31.27±7.83）%］，呈现显著的剂量相关性，与对照组相比，4.48×10^9 颗粒/mL 处理组的凋亡率升高约 3.4 倍，且晚期凋亡比例随着 DF-EVLPs 浓度的增加而上升，提示 DF-EVLPs 可能通过激活 Caspase 通路导致膜完整性丧失。

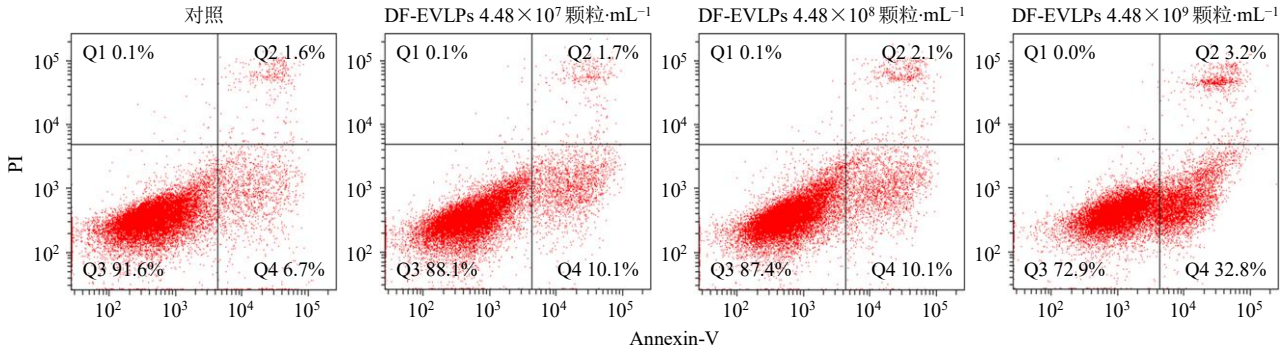


图 11　流式细胞术检测细胞凋亡结果

Fig. 11　Flow cytometry results of apoptosis

表 7　流式细胞术凋亡定量（$\bar{x}\pm s$，$n=3$）

Table 7　Quantitative analysis of apoptosis by flow cytometry ($\bar{x}\pm s$, $n=3$)

组别	颗粒浓度/(颗粒·mL⁻¹)	细胞凋亡率/%
对照	−	9.13±0.91
DF-EVLPs	4.48×10^7	11.27±0.92**
	4.48×10^8	11.57±0.90*
	4.48×10^9	31.27±7.83*

与对照组比较：*$P<0.05$　**$P<0.01$。

*$P<0.05$　**$P<0.01$ *vs* control group.

2.5　蛋白免疫印迹实验

采用蛋白质免疫印迹（Western blotting）法检测凋亡相关蛋白的表达水平，以验证 DF-EVLPs 对结肠癌细胞凋亡的影响。鉴于流式细胞术实验结果显示 DF-EVLPs 可显著诱导 CT26 细胞凋亡，因此，本实验选择与凋亡相关蛋白进行验证。Bax/Bcl-2 是控制线粒体相关的凋亡因子释放的关键调控因子，Bax 与抗凋亡蛋白 Bcl-2 的比例能够决定线粒体膜通透性。促凋亡蛋白 Bax 一般以单体形式存在于细胞基质中，当接收到凋亡信号时，Bax 重新定位于线粒体表面，在线粒体表面构成跨线粒体膜的孔，导致膜电位降低，膜通透性增加，释放凋亡因子。

Caspase-3 是凋亡执行蛋白，有研究发现在许多细胞系中都有发现 Caspase-3 的表达，其切割形式 cleaved Caspase-3 是凋亡激活标志，因此 cleaved Caspase-3 的检测也是凋亡研究中的常用手段。取对数生长期的 CT26 细胞以每孔 2×10^5 密度接种于 6 孔板，37 ℃、5% CO_2 培养过夜。贴壁后给药组加入 DF-EVLPs（4.48×10^9 颗粒/mL），对照组加入等

体积培养基，继续孵育 24 h。收集细胞，PBS 洗涤后液氮速冻，于−80 ℃保存备用。蛋白提取时，将细胞在冰上解冻，加入 RIPA 裂解液裂解，12 000 r/min 离心（半径 10 cm）15 min 取上清，BCA 法测定蛋白浓度并归一化。蛋白样品加入上样缓冲液后煮沸 5 min。配制 12%分离胶和 5%浓缩胶进行 SDS-PAGE，每孔上样 30 μg 总蛋白，恒压 80 V 电泳至样品进入分离胶后切换至 120 V。

采用 0.22 μm PVDF 膜（甲醇活化）进行湿转（200 mA，60 min）。转膜后用快速封闭液室温封闭 20 min，然后分别以相应一抗（4 ℃过夜）和二抗（室温 2 h）孵育，TBST 洗涤后 ECL 显影，凝胶成像仪拍照，Image J 软件分析灰度值。结果如图 12 和表 8 所示，DF-EVLPs 与 CT26 细胞孵育 24 h 后，促凋亡蛋白 Bax 表达上调，抗凋亡蛋白 Bcl-2 下调，Bax/Bcl-2 值显著升高，cleaved Caspase-3 表达上调，Caspase-3 表达下调。Western blotting 结果与流式细胞术检测凋亡率结果一致，为 DF-EVLPs 的抗肿瘤机制提供了分子水平证据。

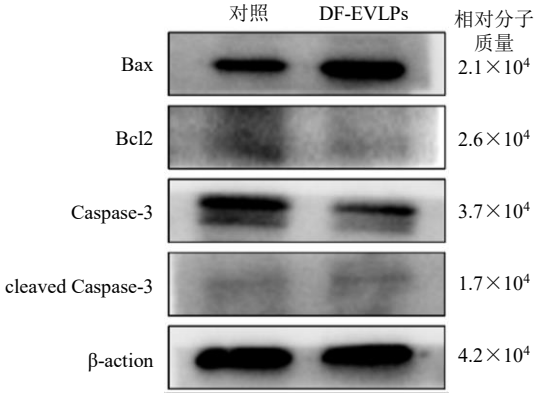


图 12　DF-EVLPs 对凋亡蛋白表达影响

Fig. 12　Effect of DF-EVLPs on expression of apoptotic proteins

表 8　DF-EVLPs 对凋亡蛋白表达定量分析（$\bar{x} \pm s$，$n = 3$）

Table 8　Quantitative analysis of apoptosis protein expression by DF-EVLPs ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

组别	相对灰度值			
	Bax	Bcl2	Caspase-3	cleaved Caspase-3
对照	0.78±0.08	1.25±0.29	0.75±0.37	0.40±0.10
DF-EVLPs	0.89±0.11*	1.02±0.19**	0.60±0.24*	0.58±0.17**

与对照组比较：*P<0.05　**P<0.01。

*P < 0.05　**P < 0.01 *vs* control group.

3　讨论

结直肠癌仍是全球紧迫的健康负担，从腺瘤到癌变的长周期为早期干预提供了窗口。当前主流疗法（手术、化疗、靶向治疗）常伴有并发症、全身毒性和患者适应性有限等缺陷，亟需更安全、适用范围更广的策略。源于天然产物的多靶点干预因此成为有吸引力的研究方向。本研究从铁皮石斛花中分离出 DF-EVLPs，证明其通过上调发挥抗肿瘤效应且安全性优异，为结直肠癌治疗提供了有前景的天然纳米治疗剂。

植物来源 EVLPs 是天然脂双层包被的纳米颗粒，携带蛋白质、脂质和 RNA 等功能性货物，在植物细胞间通讯中起关键作用[18-20]。作为天然的药物递送系统，相比于哺乳动物 EVLPs，PEVLPs 具有低免疫原性、高生物相容性和优异稳定性等优势。近年来在抗肿瘤领域受到广泛关注，大量研究证实其具有强效的多方面抗肿瘤能力[21]。例如，柠檬来源 EVLPs 通过活性氧（reactive oxygen species，ROS）介导的细胞周期阻滞诱导胃癌细胞凋亡；人参来源 EVLPs 可将肿瘤相关巨噬细胞重编程为抗肿瘤表型[22-23]。此外，Zhou 等[24]从掌叶半夏中分离的 PPS-ELNs 在 10 μg/mL 质量浓度下对 HCT116 和 HT-29 细胞具有显著增殖抑制作用，而对正常结肠上皮细胞 FHC 无明显细胞毒性；机制上，PPS-ELNs 通过溶酶体介导的线粒体自噬通路诱导结直肠癌细胞凋亡。本研究中 DF-EVLPs 同样表现出对 CT26 细胞的高效杀伤和对 NCM460 正常细胞的低毒性，但其作用机制为调控 Bax/Bcl-2 信号通路触发线粒体介导的凋亡级联反应，与 PPS-ELNs 的线粒体自噬通路不同但均靶向线粒体功能，提示线粒体可能是植物外泌体抗结直肠癌的共同作用靶点之一。与此同时，已有研究[25]表明从铁皮石斛花总黄酮中发现类似的上调 Bax/Bcl-2、Caspase-3 和 cleaved Caspase-3 的作用，但本研究首次从外泌体层面证明，石斛花的抗肿瘤机制可能部分通过其外泌体样颗粒传递活性成分而实现。

与此同时，植物来源 EVLPs 的潜力还延伸至药物递送系统，如贯叶金丝桃来源 EVLPs 能显著增强金丝桃素的光动力疗效[26]。结合 2 种背景，本实验研究了铁皮石斛花来源的 DF-EVLPs，证明其不仅符合多靶点植物纳米药物的新兴范式，而且对结直肠癌具有独特而强效的作用机制。为此，本实验成功分离并表征了 DF-EVLPs。所得 DF-EVLPs 为均一纳米颗粒，粒径（156.9±7.2）nm。此外，对 DF-EVLPs 作为 EVLPs 的标志物进行了初步分析，结果显示其含有大量相对分子质量在 1.50×10^5 以下

的蛋白。因此，推测 DF-EVLPs 的抗结肠癌活性可能主要由其携带的蛋白质等介导，而多糖、黄酮等小分子成分的含量及贡献有待后续研究，并且，提取的 DF-EVLPs 具有良好的批次间稳定性及血液安全性。

植物来源 EVLPs 的提取面临植物细胞壁、次生代谢物及多糖等多组分的干扰，这使其纯化远比哺乳动物外泌体系统复杂。植物基质中富含多糖、多酚、细胞器碎片及细胞壁组分，这些成分在超速离心过程中可能与目标囊泡共沉淀，从而影响后续功能实验的归因判断。因此，在植物外泌体研究中设置适当的基质对照（matrix control）对于排除非囊泡成分的干扰至关重要。

本研究在 DF-EVLPs 的提取过程中，通过多步差速离心（4 000×*g*、10 000×*g*）预先去除细胞碎片、细胞器及大颗粒杂质，随后采用 100 000×*g* 超速离心富集囊泡，这一流程在一定程度上减少了基质成分的共沉淀。然而，本研究未设置独立的基质对照（即对不含外泌体的空白植物基质进行平行提取，以评估非囊泡成分的残留情况）。因此，不能完全排除少量可溶性蛋白、多糖或色素等植物基质成分与 DF-EVLPs 共纯化的可能性[27-28]。此外，由于植物外泌体领域尚缺乏公认的特异性标志物（如哺乳动物外泌体的 CD63、CD81、CD9 等），PELNs 的鉴定主要依赖形态学（TEM）、粒径（NTA）及蛋白质/RNA 组成分析。

本研究通过 TEM 观察到典型的杯状形态、NTA 检测到符合外泌体粒径范围的颗粒（156.9±7.2）nm，以及 SDS-PAGE 显示丰富的蛋白条带，从多个维度证实了所提取颗粒的外泌体样性质。但上述表征手段无法完全区分真正的囊泡与共沉淀的蛋白聚集体或脂质复合物。未来研究应采用密度梯度离心（如蔗糖或碘克沙醇梯度）对 DF-EVLPs 进行进一步纯化，以更严格地区分囊泡与非囊泡成分；同时设置基质对照，将平行提取的空白基质组分纳入功能实验的对照体系，以更准确地评估 DF-EVLPs 的特异性活性。此外，本实验表明，相比于其他几种癌细胞，DF-EVLPs 可有效被 CT26 细胞摄取并展现出极强毒性的同时，不会对正常结肠上皮细胞（NCM460）造成损伤。针对其对 CT26 细胞的强大毒性，采用划痕实验、平板克隆及流式细胞术进行进一步验证，所有实验结果均显示出 DF-EVLPs 对 CT26 的增殖抑制能力。最终，为探明其分子层面作用机制，发现 DF-EVLPs 可以通过调控 Bax/Bcl-2 通路来抑制 CT26 增殖。

尽管通过体外实验证实了 DF-EVLPs 可被 CT26 结肠癌细胞摄取，并通过调控 Bax/Bcl-2 通路诱导细胞凋亡，展现了良好的靶向性和抗肿瘤活性。但本研究采用 pKH26 标记 DF-EVLPs 进行细胞摄取观察，标记后通过截留相对分子质量 3 000 超滤去除游离染料。尽管该方法在同类研究中已有应用，但 pKH26 染料在标记过程中可能形成非特异性荧光纳米颗粒，其在粒径和荧光强度上与标记外泌体难以区分，可能对细胞摄取结果的解释带来假阳性风险[29]。理想的验证方案应包含 pKH26 染料对照（无外泌体）、标记后外泌体的蔗糖密度梯度离心纯化，以及内化共定位实验（如与溶酶体标记物共定位或细胞膜荧光淬灭实验）。本研究的局限性在于未开展上述验证，后续工作将采用 pH 敏感型荧光探针（如 pHrodo）并结合共聚焦显微镜的 Z-stack 扫描和内化验证实验，以更严格地确认 DF-EVLPs 的细胞内化。尽管略有不足，但本研究已通过时间相关性摄取实验和细胞选择性毒性数据，从侧面验证了标记外泌体的内化特征。

本研究通过 CCK-8 法、划痕实验、流式细胞术及 Western blotting 等体外实验，从细胞增殖、迁移、凋亡及标志蛋白表达等多个维度间接验证了 DF-EVLPs 的抗结肠癌活性。这些方法是目前植物外泌体功能研究中的常用手段，但其本身存在若干固有局限性，需在此予以说明。首先，CCK-8 法和活/死细胞染色法检测的“细胞活性”本质上是线粒体脱氢酶活性和细胞膜完整性的间接反映，而非对细胞存活状态的直接测量。DF-EVLPs 中的某些成分（如纳米颗粒本身或共纯化的植物代谢物）可能干扰线粒体代谢活性或染料摄取/释放过程，从而导致细胞活性读数出现假性升高或降低。

本研究通过 CCK-8 与活/死细胞染色 2 种不同原理的方法交叉验证细胞毒性，在一定程度上降低了单一方法带来的假阳性风险，后续研究应结合活细胞实时成像、线粒体膜电位检测（如 JC-1 染色）、Caspase-3/7 活性荧光检测等更直接的药效学方法，对 DF-EVLPs 的促凋亡作用进行多重验证。与此同时，体外实验难以模拟体内复杂的生理环境，包括药物在体内的吸收、分布、代谢与排泄过程，以及肿瘤微环境中多种细胞组分和基质成分的相互作用。但 DF-EVLPs 给药后是否能够保持结构完整性

并有效到达肠道肿瘤部位，其在体内是否具有生物安全性，以及是否能够通过调节肠道菌群发挥间接抗肿瘤作用，均有待进一步验证。此外，本研究未对 DF-EVLPs 中的多糖、黄酮等小分子成分进行定量检测，其是否参与抗肿瘤作用尚不清楚。基于此，后续研究将进一步深化对 DF-EVLPs 中的蛋白质组及脂质组的全面解析以及在动物水平上探讨 DF-EVLPs 的抗肿瘤效果及其作用机制，以期为 DF-EVLPs 作为靶向结肠癌的天然纳米制剂提供更全面的实验依据。

综上所述，本研究基于超速离心流程，从 500 g 新鲜铁皮石斛鲜花中制备得到 1 mL DF-EVLPs 产物，颗粒浓度为 8.22×10^{10} 颗粒/mL。按此推算，每克鲜花可提供约 1.64×10^{8} 个 DF-EVLPs。体外活性实验中所用的 10^{9} 颗粒/mL 浓度对应约 6 g 鲜花的提取当量。国家食品安全风险评估中心规定铁皮石斛花的推荐日食用量为≤3 g（以干品计），按干鲜比 1∶5 折算，6 g 鲜花约相当于 1.2 g 干花，显著低于安全限值。鉴于其具有良好的血液相容性，并能够被 CT26 结肠癌细胞高效摄取，同时对人正常结肠上皮细胞 NCM460 无明显细胞毒性。体外功能实验进一步证实，DF-EVLPs 可显著抑制 CT26 细胞的增殖、迁移及克隆形成能力，并通过流式细胞术验证其诱导细胞凋亡的作用。机制研究表明，DF-EVLPs 通过调控 Bax/Bcl-2 信号通路，上调促凋亡蛋白 Bax、下调抗凋亡蛋白 Bcl-2，从而触发线粒体介导的凋亡级联反应，发挥抗结肠癌活性。这些结果表明，DF-EVLPs 作为一种源于“药食同源”中药的新型天然纳米递送系统，具有良好的靶向性、安全性和体外抗肿瘤效果，为后续基于植物来源 EVLPs 的结直肠癌治疗策略提供了实验依据。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

[1] Bray F, Laversanne M, Sung H, *et al*. Global cancer statistics 2022: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries [J]. *CA Cancer J Clin*, 2024, 74(3): 229-263.

[2] Zou Y Q, Wang S L, Zhang H H, *et al*. The triangular relationship between traditional Chinese medicines, intestinal flora, and colorectal cancer [J]. *Med Res Rev*, 2024, 44(2): 539-567.

[3] Ungaro R, Mehandru S, Allen P B, *et al*. Ulcerative colitis [J]. *Lancet*, 2017, 389(10080): 1756-1770.

[4] Chen W H, Lu J M, Zhang J H, *et al*. Traditional uses, phytochemistry, pharmacology, and quality control of *Dendrobium officinale* Kimura et. Migo [J]. *Front Pharmacol*, 2021, 12: 726528.

[5] 但武龙, 杨菁, 陈智勇, 等. 白及多糖和甘草酸共稳定的青藤碱纳米乳的制备及其体外抗炎评价 [J]. 中草药, 2026, 57(1): 95-108.

[6] Elliott R O, He M. Unlocking the power of exosomes for crossing biological barriers in drug delivery [J]. *Pharmaceutics*, 2021, 13(1): 122.

[7] Chen C C, Liu L N, Ma F X, *et al*. Elucidation of exosome migration across the blood-brain barrier model *in vitro* [J]. *Cell Mol Bioeng*, 2016, 9(4): 509-529.

[8] Liang Y J, Duan L, Lu J P, *et al*. Engineering exosomes for targeted drug delivery [J]. *Theranostics*, 2021, 11(7): 3183-3195.

[9] Madhan S, Dhar R, Devi A. Plant-derived exosomes: A green approach for cancer drug delivery [J]. *J Mater Chem B*, 2024, 12(9): 2236-2252.

[10] Rahmati S, Karimi H, Alizadeh M, *et al*. Prospects of plant-derived exosome-like nanocarriers in oncology and tissue engineering [J]. *Hum Cell*, 2024, 37(1): 121-138.

[11] 中国药典 [S]. 一部. 2025: 303-304.

[12] Li P Y, Li L, Wang Y Z. Traditional uses, chemical compositions and pharmacological activities of *Dendrobium*: A review [J]. *J Ethnopharmacol*, 2023, 310: 116382.

[13] Liu X L, Wu J J, Zhao B L, *et al*. *Dendrobium officinale* Kimura et Migo: Traditional uses, agricultural technology, processing, chemical composition, pharmacological mechanisms, toxicology, and applications [J]. *J Pharm Pharmacol*, 2025, 77(12): 1611-1645.

[14] Zhao W, Li J, Zhong C, *et al*. Green synthesis of gold nanoparticles from *Dendrobium officinale* and its anticancer effect on liver cancer [J]. *Drug Deliv*, 2021, 28(1): 985-994.

[15] Bao H, Bao H N, Wang Y, *et al*. Challenges and strategies in the industrial application of *Dendrobium officinale* [J]. *Plants*, 2024, 13(21): 2961.

[16] Luo P, Huang C, Guo J, *et al*. Network pharmacology and anticancer mechanism study of *Dendrobium nobile* dendrobine in the treatment of colorectal cancer [J]. *Discov Oncol*, 2024, 15(1): 768.

[17] Xiao L L, Wang J Y, Yu M Z, *et al*. Emerging nutritional potential of edible-medicinal homologous *Coix lacryma-jobi* seed-derived exosomes for treatment of ulcerative colitis [J]. *Int J Biol Macromol*, 2025, 332: 148799.

[18] Behbahani G D, Khani S, Hosseini H M, *et al*. The role of exosomes contents on genetic and epigenetic alterations of

recipient cancer cells [J]. *Iran J Basic Med Sci*, 2016, 19(10): 1031-1039.

[19] Donoso-Quezada J, Ayala-Mar S, González-Valdez J. The role of lipids in exosome biology and intercellular communication: Function, analytics and applications [J]. *Traffic*, 2021, 22(7): 204-220.

[20] Guay C, Menoud V, Rome S, *et al*. Horizontal transfer of exosomal microRNAs transduce apoptotic signals between pancreatic beta-cells [J]. *Cell Commun Signal*, 2015, 13: 17.

[21] Subha D, AnuKiruthika R, Sreeraj H, *et al*. Plant exosomes: Nano conveyors of pathogen resistance [J]. *Discov Nano*, 2023, 18(1): 146.

[22] Phutela K, Bal A, Singh N, *et al*. Hydroxycitrate-loaded exosomes demonstrate enhanced therapeutic efficacy against lung adenocarcinoma by inhibiting the metabolic enzyme ATP citrate lyase [J]. *Nanoscale Adv*, 2025, 7(12): 3846-3858.

[23] Zhu L J, Chen X Q, Lin Q Y, *et al*. Ginseng-derived exosomes attenuate immune evasion in NSCLC via PD-L1 modulation [J]. *Cancer Manag Res*, 2025, 17: 1503-1512.

[24] Zhou P S, Zhang Q L, Zhou X T, *et al*. *Pinellia pedatisecta* Schott-derived exosome-like nanovesicles promote apoptosis in colorectal cancer by regulating the lysosome-mediated mitophagy pathway [J]. *Food Sci Nutr*, 2026, 14(2): e71500.

[25] 梁婉婷, 王新婷, 朱朋艳, 等. 基于网络药理学分析铁皮石斛花总黄酮抑制结肠癌作用机制及体外实验验证 [J]. 中南药学, 2022, 20(12): 2772-2780.

[26] Ma X Y, Chen N, Zeng P Y, *et al*. *Hypericum perforatum*-derived exosomes-like nanovesicles: A novel natural photosensitizer for effective tumor photodynamic therapy [J]. *Int J Nanomed*, 2025, 20: 1529-1541.

[27] Xiao Y, Feng L Q, Zhao X, *et al*. An optimized protocol for plant extracellular vesicles isolation from *Ophiopogon japonicus* root: A comparative evaluation based on miRNA cargo [J]. *Plant Meth*, 2025, 22(1): 4.

[28] 帖慧琳, 李春磊, 王浩然, 等. 植物外泌体提取及应用研究进展 [J]. 食品与药品, 2020, 22(6): 503-508.

[29] Pužar Dominkuš P, Stenovec M, Sitar S, *et al*. PKH26 labeling of extracellular vesicles: Characterization and cellular internalization of contaminating PKH26 nanoparticles [J]. *Biochim Biophys Acta Biomembr*, 2018, 1860(6): 1350-1361.

[责任编辑 郑礼胜]