

• 药理与临床 •

半边莲来源细胞外囊泡样纳米颗粒通过重塑谷氨酰胺代谢诱导肝癌细胞自噬及其体内抗肿瘤作用

吴 玲^{1,2}, 唐锦程^{1,2}, 张婧婷^{1,2}, 胡 炬^{1,2}, 谭小宁³, 杨仁义^{3*}, 曾普华^{3*}

1. 湖南省中西医结合医院, 湖南 长沙 410006

2. 湖南中医药大学, 湖南 长沙 410208

3. 湖南省中医药研究院 中医肿瘤研究所, 湖南 长沙 410006

摘要: 目的 阐明半边莲来源细胞外囊泡样纳米颗粒 (*Lobelia chinensis*-derived extracellular vesicle-like nanoparticles, LC-EVLP) 通过重塑谷氨酰胺代谢网络诱导肝癌细胞致死性自噬的分子机制, 并系统评价其抗肿瘤活性与生物安全性。方法 采用超速离心法分离 LC-EVLP 并进行理化表征。结合网络药理学、分子对接及多维度细胞功能实验, 评估 LC-EVLP 对人肝癌 Mahlavu 细胞增殖、迁移及侵袭的抑制作用。利用自噬流阻断剂与代谢中间体 α -酮戊二酸 (α -ketoglutaric acid, α -KG) 开展回补实验, 验证“代谢-自噬”调控轴; 构建裸鼠皮下移植瘤模型, 检测 LC-EVLP 的体内抗肿瘤作用与主要脏器组织病理学变化。结果 成功分离获得 LC-EVLP, 其呈典型囊泡结构, 粒径主要分布于 126.0~151.7 nm, 并被 Mahlavu 细胞有效摄取。功能实验表明, LC-EVLP 在 $\geq 12.5 \mu\text{g/mL}$ 时显著抑制 Mahlavu 细胞活力 ($P < 0.001$), 而对 LO2 正常肝细胞无显著影响。进一步研究发现, LC-EVLP 显著抑制 Mahlavu 细胞克隆形成能力及 DNA 合成 ($P < 0.05$ 、 0.01 、 0.001), 并显著降低细胞迁移和侵袭能力 ($P < 0.001$)。自噬抑制剂巴佛洛霉素 A1 (bafilomycin A1, BafA1) 可显著回补细胞活力 ($P < 0.001$), 表明自噬性细胞死亡是 LC-EVLP 发挥抗肝癌活性的主导方式。LC-EVLP 显著上调 Beclin 1 蛋白表达 ($P < 0.05$ 、 0.01 、 0.001), 提高微管相关蛋白 1 轻链 3-II/I (microtubule associated protein 1 light chain 3-II/I, LC3-II/I) 值 ($P < 0.05$ 、 0.01), 并降低 p62 蛋白的表达 ($P < 0.01$ 、 0.001), 且 BafA1 进一步增强 LC3-II/I 的累积并逆转 p62 表达下降 ($P < 0.01$ 、 0.001), 证实其促进自噬流通畅。代谢方面, LC-EVLP 显著抑制丙酮酸脱氢酶激酶 1 (pyruvate dehydrogenase kinase 1, PDK1)、丙酮酸激酶 M 型 (pyruvate kinase M, PKM) 及谷氨酰胺酶 1 (glutaminase 1, GLS1) 表达 ($P < 0.01$ 、 0.001), α -KG 回补可逆转自噬异常 ($P < 0.01$)。体内实验结果显示, LC-EVLP 显著抑制肿瘤生长 ($P < 0.05$ 、 0.001), 下调 Ki67 和 PCNA 表达 ($P < 0.001$), 并诱导自噬相关蛋白变化 ($P < 0.05$ 、 0.01 、 0.001), 且未见明显毒性。结论 LC-EVLP 通过调控 PDK1/PKM 轴干扰细胞代谢平衡, 并诱导自噬过程增强, 从而发挥抗肿瘤作用。其较低的毒性特征提示其具有进一步作为天然纳米抗肿瘤制剂开展研究的潜在价值。

关键词: 半边莲来源细胞外囊泡样纳米颗粒; 肝细胞癌; 自噬; 谷氨酰胺代谢; PDK1/PKM 轴

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2026)19-7631-20

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2026.19.012

Lobelia chinensis*-derived extracellular vesicle-like nanoparticles induce autophagy in hepatocellular carcinoma cells by reshaping glutamine metabolism and exert anti-tumor effect *in vivoWU Ling^{1,2}, TANG Jingcheng^{1,2}, ZHANG Jingting^{1,2}, HU Ju^{1,2}, TAN Xiaoning³, YANG Renyi³, ZENG Puhua³

收稿日期: 2026-02-03

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (82074425); 国家重大疑难疾病中西医临床协作项目 (ZDYN-2024-A-097); 国家中医药管理局中西医结合与民族医药项目 (ZXYJHMZYYS2024-034); 湖南省自然科学基金项目 (2025JJ30038); 湖南省重点研发计划 (2023SK2057); 湖南省卫生健康研究项目 (20232605); 湖南省卫生健康委员会重点项目 (20257856); 湖南省卫生高层次人才重大科研计划 (R2023081); 长沙市杰出青年科技人才培养计划 (kq2506025); 湖南省芙蓉卫生健康人才项目 (湘卫函 [2024] 182 号); 湖南省十四五骨干人才 (湘中医药 [2024] 3 号); 2025 年度湖南省医学学科 C 类建设项目 (中医肿瘤科) (湘卫医发 [2025] 7 号); 实脾消积方联合规范二线系统治疗经靶向联合免疫治疗进展后肝细胞癌的临床疗效及病证优势人群研究 (B20260075); 湖南中医药大学研究生科研创新项目 (2025CX191)

作者简介: 吴 玲, 女, 硕士研究生, 从事中医药防治恶性肿瘤研究。E-mail: 20233379@stu.hnucm.edu.cn***通信作者:** 曾普华, 男, 博士, 主任医师, 博士生导师, 从事中西医结合防治恶性肿瘤研究。E-mail: zph120@126.com

杨仁义, 男, 博士, 从事中医药防治恶性肿瘤研究。E-mail: 20222133@stu.hnucm.edu.cn

1. Hunan Provincial Integrated Traditional Chinese and Western Medicine Hospital, Changsha 410006, China
2. Hunan University of Chinese Medicine, Changsha 410208, China
3. Institute of Traditional Chinese Medicine Oncology, Hunan Academy of Traditional Chinese Medicine, Changsha 410006, China

Abstract: Objective To elucidate the molecular mechanism by which *Lobelia chinensis*-derived extracellular vesicle-like nanoparticles (LC-EVLP) induce lethal autophagy in hepatocellular carcinoma (HCC) by remodeling the glutamine metabolic network, and to systematically evaluate their antitumor efficacy and biosafety. **Methods** LC-EVLP were isolated by differential ultracentrifugation and physicochemically characterized. By integrating network pharmacology, molecular docking and multidimensional cell-based assays, the effects of LC-EVLP on the proliferation, migration and invasion of human HCC Mahlavu cells were assessed. Rescue experiments using an autophagic-flux inhibitor and the metabolic intermediate α -ketoglutarate (α -KG) were conducted to interrogate the “metabolism-autophagy” regulatory axis. A nude mouse subcutaneous xenograft model was established to evaluate the *in vivo* anti-tumor effects of LC-EVLP and histopathological changes in major organs. **Results** LC-EVLP was successfully isolated and characterized as typical vesicular structures with particle sizes mainly distributed between 126.0 and 151.7 nm, and were efficiently internalized by Mahlavu cells. Functional assays demonstrated that LC-EVLP significantly reduced the viability of Mahlavu cells at concentrations $\geq 12.5 \mu\text{g/mL}$ ($P < 0.001$), while exerting no significant cytotoxicity toward LO2 cells. Further analyses revealed that LC-EVLP significantly inhibited colony formation and DNA synthesis ($P < 0.05, 0.01, 0.001$), and significantly suppressed cell migration and invasion ($P < 0.001$). The autophagy inhibitor bafilomycin A1 (BafA1) significantly rescued cell viability ($P < 0.001$), indicating that autophagic cell death was the dominant mechanism underlying the anti-HCC activity of LC-EVLP. LC-EVLP significantly upregulated Beclin 1 expression ($P < 0.05, 0.01, 0.001$), increased microtubule associated protein 1 light chain 3-II/I (LC3-II/I) value ($P < 0.05, 0.01$), and reduced p62 protein expression ($P < 0.01, 0.001$). Moreover, BafA1 further enhanced LC3-II/I accumulation and reversed the decrease in p62 expression ($P < 0.01, 0.001$), confirming the promotion of a complete autophagic flux. In terms of metabolic regulation, LC-EVLP significantly downregulated the expressions of pyruvate dehydrogenase kinase 1 (PDK1), pyruvate kinase M (PKM) and glutaminase 1 (GLS1) ($P < 0.01, 0.001$), while α -KG supplementation reversed the abnormal autophagic phenotype ($P < 0.01$). The *in vivo* experimental results showed that LC-EVLP significantly inhibited tumor growth ($P < 0.05, 0.001$), downregulated Ki67 and PCNA expressions ($P < 0.001$), and induced changes in autophagy related proteins ($P < 0.05, 0.01, 0.001$), with no significant toxicity observed. **Conclusion** LC-EVLP exerts anti-tumor effects by regulating PDK1/PKM axis, disrupting cellular metabolic balance and inducing enhanced autophagy. Its low toxicity characteristics suggest its potential for further research as a natural nanomaterial-based antitumor agent.

Key words: *Lobelia chinensis*-derived extracellular vesicle-like nanoparticles; hepatocellular carcinoma; autophagy; glutamine metabolism; PDK1/PKM axis

肝细胞癌（hepatocellular carcinoma, HCC）是常见的原发性肝癌类型之一，在全球癌症相关死亡中占据重要地位，其复杂的分子异质性导致临床治疗极具挑战^[1]。目前，以索拉非尼和仑伐替尼为代表的分子靶向药物虽已成为晚期 HCC 的一线治疗方案，但其严重的脱靶毒性及频发的获得性耐药在一定程度上限制了患者的长期获益^[2-3]。近年来的多组学研究表明，代谢重编程被认为是恶性肿瘤的重要特征之一，并在肿瘤耐药形成过程中发挥关键作用^[4]。因此，开发能够特异性靶向肿瘤代谢脆弱性兼具高生物安全性与精准递送能力的新型纳米药物，已成为肿瘤药理学领域的迫切需求。

为满足快速增殖对生物量和能量的巨大需求，HCC 细胞表现出显著的代谢可塑性，即在增强有氧糖酵解（Warburg 效应）的同时，高度依赖谷氨酰胺

的回补途径以维持三羧酸循环（tricarboxylic acid cycle, TCA）的运转^[5-6]。在此过程中，丙酮酸脱氢酶激酶 1（pyruvate dehydrogenase kinase 1, PDK1）和丙酮酸激酶 M 型（pyruvate kinase M, PKM）作为糖酵解与氧化磷酸化之间的代谢平衡中发挥重要作用，严密调控着碳通量的分配。现有研究指出，打破 PDK1/PKM 介导的代谢稳态，可能影响肿瘤细胞的能量供给，并诱导代谢应激反应^[7]。严重的代谢应激与自噬调节密切相关^[8-9]。自噬通常作为一种细胞保护机制，通过回收受损细胞器提供生存底物；然而，当代谢阻断突破细胞的代偿阈值时，过度激活的自噬流将由“保护者”转变为“执行者”，触发不可逆的 II 型程序性细胞死亡^[10]。因此，通过重塑谷氨酰胺代谢轴诱导 HCC 细胞发生致死性自噬，可能为肿瘤治疗提供新的干预思路。

在寻找高效低毒的代谢调节剂过程中,植物来源的纳米囊泡(plant-derived nanovesicles, PDNVs)凭借其独特的“跨界通讯”能力引起了纳米医学界的广泛关注。与合成脂质体或外泌体相比,PDNVs 不仅天然具备能够逃避免疫清除的脂质双分子层结构,更富含植物特有的活性蛋白质、功能性脂质及 miRNA^[11-12]。研究证实,PDNVs 能够通过多种途径被哺乳动物细胞摄取,并发挥抗炎、抗氧化及抗肿瘤等多重生物学效应^[13]。

半边莲 *Lobelia chinensis* Lour. 作为一种药用历史悠久的传统中草药,以其卓越的清热解毒及利水消肿功效著称。在传统中医临床实践中,半边莲常被用于治疗晚期肝病伴发的腹水及湿热黄疸,显示出其对肝脏病理微环境具有显著的改善作用^[14]。尽管现有药理学研究已证实其富含的生物碱及黄酮类化合物具有多种生物活性^[15],但目前学界对半边莲抗肝癌潜力的关注仍主要局限于单一小分子化合物的筛选,其确切的药效物质基础及深层作用机制,尤其是否存在具有生物活性的天然纳米囊泡及其对肿瘤代谢微环境的调控作用,尚缺乏系统性的科学解析。鉴于此,本研究聚焦于半边莲来源细胞外囊泡样纳米颗粒(*Lobelia chinensis*-derived extracellular vesicle-like nanoparticles, LC-EVLP),探讨其活性成分对 PDK1/PKM 信号轴及谷氨酰胺代谢的调控作用,以及该过程与 HCC 细胞自噬反应的关联。本研究采用超速离心法分离并表征 LC-EVLP 的理化特性,在细胞及动物模型中评估其抗肝癌作用;结合分子生物学及相关功能实验,探讨 LC-EVLP 对肿瘤细胞代谢相关过程及自噬反应的影响,并对其生物安全性进行初步评价,为理解中药来源纳米结构在肿瘤相关生物学过程中的作用提供实验依据,并为天然纳米体系在抗肿瘤领域的进一步研究提供参考。

1 材料

1.1 细胞

人肝癌 Mahlavu 细胞(批号 CL-0735)购自武汉普诺赛生命科技有限公司;LO2 人正常肝细胞(批号 STM-CL-5770)购自思泰默(上海)生物科技有限公司。

Mahlavu 细胞用含 10%胎牛血清和 1%青霉素-链霉素双抗溶液的 DMEM 培养基,LO2 细胞用含 10%胎牛血清和 1%青霉素-链霉素双抗溶液的 RPMI 1640 培养基,在 37 ℃、5% CO₂ 的饱和湿度

培养箱中培养。细胞培养 1 d 后进行传代培养,取处于对数期且生长状态良好的细胞进行后续实验。

1.2 动物

SPF 级雄性 BALB/c 裸鼠,6 周龄,体质量 18~22 g,购自湖南斯莱克景达实验动物有限公司,动物质量合格证号 ZS-202504150048。动物饲养于湖南中医药大学动物实验中心,12 h 明/暗循环,自由摄食饮水,所有裸鼠适应性喂养 1 周后开始实验。动物实验严格按照湖南中医药大学动物护理和使用委员会制定的伦理学原则和规定进行,伦理批准号 HNUCM21-2410-49。

1.3 药材

新鲜半边莲(批号 26010603)购自湖南省中西医结合医院,经任湖南省中医药研究院张水寒教授鉴定为桔梗科植物半边莲 *L. chinensis* Lour. 的全草,符合《中国药典》2025 年版规定。

1.4 药品与试剂

超高速离心管(批号 344326)购自贝克曼库尔特商贸(中国)有限公司;DMEM 高糖细胞培养基(批号 PM150210)、青霉素-链霉素溶液(批号 PB180120)、RPMI 1640 培养基(批号 PM150110)购自武汉普诺赛生命科技有限公司;胎牛血清(批号 F0193)购自默克生命科学技术有限公司;0.25%胰蛋白酶-EDTA(批号 25200-072)购自美国赛默飞世尔科技公司;CCK-8 试剂盒(批号 K1018)购自美国 APEX BIO 公司;BCA 蛋白浓度测定试剂盒(批号 P0399S)、细胞膜 Dil 红色荧光探针(批号 C1036)、LysoTracker(批号 C1046)、AF488 标记的山羊抗兔 IgG 二抗(批号 A0423)、Cy3 标记的山羊抗兔 IgG 二抗(批号 A0516)购自上海碧云天生物技术有限公司;FITC 标记的鬼笔环肽(批号 CA1620)购自北京索莱宝科技有限公司;EDU 试剂盒(批号 E-CK-A376)购自武汉伊莱瑞特生物科技股份有限公司;自噬抑制剂巴佛洛霉素 A1(bafilomycin A1, BafA1, 批号 HY-100558)、铁死亡抑制剂 Ferrostatin-1(Fer-1, 批号 HY-100579)、凋亡抑制剂 Z-VAD-FMK(批号 HY-16658B)、坏死性凋亡抑制剂 Necrostatin-1(Nec-1, 批号 HY-15760)、自噬流阻断剂与代谢中间体 α -酮戊二酸(α -ketoglutaric acid, α -KG, 批号 HY-W013636)、PDK1 特异性抑制剂 DCA(批号 HY-Y0445A)购自美国 MedChemExpress 公司;微管相关蛋白 1 轻链 3B(microtubule associated protein 1 light chain 3B,

LC3B) 抗体(批号 81004-1-RR)、PDK1 抗体(批号 18262-1-AP)、HRP 标记的山羊抗兔 IgG 二抗(批号 SA00001-2) 购自武汉三鹰生物技术有限公司; p62 抗体(批号 ab109012)、Beclin 1 抗体(批号 ab207612) 购自英国 Abcam 公司; β -actin 抗体(批号 AC028) 购自武汉爱博泰克生物科技有限公司; PKM 兔抗(批号 db15553)、谷氨酰胺酶 1 (glutaminase 1, GLS1) 兔抗(批号 db15899)、Ki67 兔抗(货号 db11664)、增殖细胞核抗原(proliferating cell nuclear antigen, PCNA) 兔抗(批号 db11523) 购自杭州戴格生物技术有限公司。

1.5 仪器

ZetaView PMX 110 型纳米颗粒跟踪分析仪(nanoparticle tracking analysis, NTA, 德国 Particle Metrix 公司); 多功能酶标仪(瑞士 TECAN 公司); 超高速离心机(美国贝克曼库尔特); HT7700 型透射电子显微镜(transmission electron microscopy, TEM, 日本 Hitachi 公司); PLC PDA 检测器(美国 Waters 公司); Thermo Q Exactive 高分辨液质连用质谱仪(美国 Thermo 公司); 台式高速冷冻离心机(上海卢湘仪离心机仪器有限公司); Agilent 1290 型超高效液相色谱系统(美国 Agilent 公司)。

2 方法

2.1 LC-EVLP 的制备及表征

2.1.1 LC-EVLP 的制备 新鲜半边莲经清洗去杂后置于高速匀浆机中充分榨汁, 所得粗提液通过纱布及 0.45 μm 滤膜顺序滤过以去除大颗粒杂质。滤液经 10 000 $\times g$ 离心 60 min, 去除细胞碎片、不溶性杂质及较大细胞器和微粒。随后将上清转入超速离心管, 在超高速离心机中以 150 000 $\times g$ 离心 60 min, 沉淀物即为粗提的 LC-EVLP。将沉淀以 PBS 轻柔重悬备用。为进一步提高囊泡的纯度, 将重悬后的囊泡样品载于 8%、30%、45%、60% 蔗糖梯度溶液上, 采用超速度离心进行密度梯度分离^[16]。离心结束后, 吸取梯度中界面清晰的囊泡富集层, 并以等体积 PBS 稀释后以 10 000 $\times g$ 离心 60 min 去除蔗糖残留。最终将沉淀以适量 PBS 重悬, 充分溶解后即纯化后的 LC-EVLP 悬液, 用于后续实验。

2.1.2 TEM 观察 LC-EVLP 形态 将 LC-EVLP 悬液滴加于碳膜铜网上, 静置 1~2 min 后吸去多余液体, 加入 2% 磷钨酸(pH 6.8) 负染 30~60 s。吸干后室温晾干 ≥ 10 min。样品干燥后于 80~120 kV 条件下进行 TEM 观察, 记录囊泡的典型形态。

2.1.3 BCA 法测量 LC-EVLP 蛋白浓度 LC-EVLP 的质量浓度以总蛋白含量进行表征, 使用 BCA 法进行测定^[17]。将经超速离心及蔗糖梯度纯化的 LC-EVLP 重悬于 PBS 中。以牛血清白蛋白(bovine serum albumin, BSA) 配制 0~1 mg/mL 标准曲线, BCA 工作液按试剂 A 与 B 按 50:1 配制。在 96 孔板中加入 20 μL 样品或标准品及 200 μL 工作液(设置 3 个复孔), 37 $^{\circ}\text{C}$ 避光孵育 30 min。冷却后测定 562 nm 处的吸光度(A) 值, 根据 BSA 标准曲线计算 LC-EVLP 蛋白浓度, 用于后续实验剂量设定。

2.1.4 NTA 测定 LC-EVLP 的粒径和浓度 测量前使用 100 nm 标准颗粒对仪器进行校准。将 LC-EVLP 悬液经 0.22 μm 滤膜滤过, 以 PBS 稀释至合适质量浓度后注入样品池, 按设定的 11 个位置采集 60 s 视频。通过 ZetaView 软件分析颗粒布朗运动, 计算粒径分布及浓度。以 PBS 为空白对照, 所有参数保持一致以保证结果可重复性。

2.1.5 考马斯亮蓝染色 采用 BCA 法测定 LC-EVLP 蛋白浓度, 各样品统一上样 20 μg 。加入 5 $\times$ SDS-PAGE 上样缓冲液, 95 $^{\circ}\text{C}$ 加热 5 min 使蛋白变性后进行 10% SDS-PAGE 电泳。电泳后用甲醇-冰醋酸固定 30 min, 考马斯亮蓝染色 1 h 并脱色至背景清晰。在固定曝光条件下采集凝胶图像。

2.2 LC-EVLP 的成分分析

采用液相色谱-高分辨率串联质谱分析 LC-EVLP 的化学成分。取 LC-EVLP 悬液, 加入 4 倍体积预冷甲醇, 混匀后超声 10 min, 4 $^{\circ}\text{C}$ 、12 000 $\times g$ 离心 10 min, 取上清液, 经 0.22 μm 滤膜滤过后进行质谱分析。样品经 Agilent 1290 液相色谱系统分离, 采用 C₁₈ 反相色谱柱(100 mm $\times$ 2.1 mm, 1.8 μm), 柱温 35 $^{\circ}\text{C}$, 流动相为 0.1% 甲酸水溶液(A)-0.1% 甲酸乙腈溶液(B), 梯度洗脱: 0~2 min, 5% B; 2~20 min, 5%~95% B; 20~25 min, 95% B; 25~25.5 min, 95%~5% B; 25.5~30 min, 5% B。体积流量为 0.3 mL/min, 进样量为 5 μL 。洗脱液进入 Thermo Q Exactive 高分辨率质谱仪检测, 采用电喷雾离子化源, 在正、负离子模式下采集数据。一级质谱扫描范围为 m/z 100~1 500, 分辨率为 70 000, 自动增益控制目标值为 3×10^6 , 最大离子注入时间为 100 ms; 二级质谱采用数据依赖采集模式, 选择 Top 10 母离子进行碎裂分析, 分辨率为 17 500, 自动增益控制目标值为 1×10^5 , 最大离子注入时间为 50 ms, 碰撞能量设置为 20、40、60 eV,

动态排除时间为 5 s。离子源参数设置为：正离子模式喷雾电压 3.5 kV、负离子模式喷雾电压 3.0 kV；鞘气体积流量 35 arb，辅助气体体积流量 10 arb，毛细管温度 320 ℃。质谱数据采用 Compound Discoverer 软件进行处理，并通过 mzCloud、Metlin 数据库及半边莲植物源化合物数据库进行匹配分析，结合精确相对分子质量、MS/MS 碎片信息及对照品对主要化合物进行鉴定。

2.3 摄取实验

将纯化的 LC-EVLP 用 Dil 荧光探针标记，37 ℃避光孵育 30 min。经 150 000×g 离心 60 min 去除游离染料，沉淀以 PBS 重悬。Mahlavu 细胞接种于 12 孔板，培养至 70%~80%汇合后加入 Dil 标记的 LC-EVLP，37 ℃孵育 2 h。弃去培养基，PBS 洗涤 3 次，以 4%多聚甲醛固定 15 min。用 FITC-鬼笔环肽染色细胞骨架 30 min，DAPI 染核 10 min。通过共聚焦显微镜进行 Z 轴扫描及多视野成像，分析囊泡在细胞内的分布及其与细胞骨架的关系。

2.4 LC-EVLP 干预浓度筛选

取对数生长期的 LO2 或 Mahlavu 细胞，分别以 5×10^3 个/孔接种于 96 孔板，每孔 100 μ L，置于 37 ℃、5% CO₂ 的饱和湿度培养箱中培养，待细胞贴壁后，加入 1.560、3.125、6.250、12.500、25.000 μ g/mL LC-EVLP 悬液，每组设置 6 个复孔。对照组加入不含药物的培养基，另设置未接种细胞不给药的空白组。处理 24、48 h 后，于终点前 2 h 加入 10 μ L CCK-8 试剂，孵育 2 h 后采用酶标仪测定 450 nm 处的 A 值，计算细胞存活率。

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

2.5 细胞增殖检测

2.5.1 EdU 细胞增殖检测 将对数生长期的 Mahlavu 细胞以 1×10^4 个/孔接种于 24 孔板，贴壁后加入不同质量浓度（6.25、12.50、25.00 μ g/mL）的 LC-EVLP 处理 24 h。对照组加入不含药物的培养基，每组设置 3 个复孔。终点前加入 EdU 试剂（10 μ mol/L）孵育 1 h，细胞经 4%多聚甲醛固定 15 min，0.3% Triton X-100 通透 10 min，按照试剂盒说明书进行 Click 反应，DAPI 染核后于显微镜下观察并拍照，统计 EdU 阳性细胞（EdU⁺/DAPI⁺）比例。

2.5.2 克隆形成实验 将对数生长期的 Mahlavu 细胞以 800 个/孔接种于 6 孔板，贴壁后加入不同质量浓度（6.25、12.50、25.00 μ g/mL）的 LC-EVLP 处理 24 h。对照组加入不含药物的培养基，每组设置

3 个复孔。随后更换为新鲜培养基继续培养 10 d，每 3 天换液并维持处理。培养结束后，4%多聚甲醛固定 20 min，PBS 洗涤后以 0.1%结晶紫染色 20 min，洗净晾干，拍照并计数集落形成数。

2.6 细胞迁移和侵袭检测

2.6.1 划痕实验 将对数生长期的 Mahlavu 细胞接种于 6 孔板并培养至 90%~100%融合度，在无血清条件下加入不同质量浓度（6.25、12.50、25.00 μ g/mL）的 LC-EVLP 预处理 24 h。对照组加入不含药物的培养基，每组设置 3 个复孔。随后用 200 μ L 枪头划痕，PBS 洗涤 2 次去除脱落细胞，加入无血清培养基继续培养。分别于 0、24、48 h 采集同一视野图像，计算相对愈合率。

$$\text{相对愈合率} = (0 \text{ h 划痕面积} - \text{不同时间点划痕面积}) / 0 \text{ h 划痕面积}$$

2.6.2 Transwell 侵袭实验 Mahlavu 细胞在无血清条件下用不同质量浓度（6.25、12.50、25.00 μ g/mL）的 LC-EVLP 预处理 24 h，对照组加入不含药物的培养基。将 Matrigel 按 1:8 稀释后铺于 Transwell 上室（50 μ L/孔），37 ℃孵育 1 h 凝胶化。将处理后的细胞调整为 2×10^5 个/mL，取 200 μ L 加入上室，下室加入 600 μ L 完全培养基，37 ℃孵育 24 h。每组设置 3 个复孔。孵育结束后去除未侵袭细胞，4%多聚甲醛固定 20 min，0.1%结晶紫染色 20 min。拍照并计数侵袭细胞数。

2.7 基于网络药理学预测 LC-EVLP 诱导自噬与代谢重塑的潜在机制

2.7.1 Mhalavu 细胞死亡机制救援实验 为阐明 LC-EVLP 诱导细胞活力下降的分子机制，利用不同抑制剂^[18]探究不同细胞死亡途径的参与情况。取对数生长期的 Mhalavu 细胞以 5.0×10^3 个/孔接种至 96 孔板并培养 24 h。抑制剂组细胞分别经自噬抑制剂 Baf A1（100 nmol/L）^[19]、铁死亡抑制剂 Fer-1（1 μ mol/L）、凋亡抑制剂 Z-VAD-FMK（20 μ mol/L）及坏死性凋亡抑制剂 Nec-1（50 μ mol/L）预处理 2 h，对照组和 LC-EVLP 组加入等体积二甲基亚砜（dimethyl sulfoxide, DMSO）同步预处理 2 h。预处理结束，对照组更换为新鲜完全培养基，LC-EVLP 组和抑制剂组更换为含 LC-EVLP 的培养基共孵育 24 h。加入 10 μ L CCK-8 试剂避光孵育 2 h，采用酶标仪测定 450 nm 处的 A 值，计算细胞存活率。

2.7.2 LC-EVLP 活性成分筛选和潜在靶点预测 基于 UPLC-Q-TOF-MS 的分析结果，共鉴定出 353

种 LC-EVLP 的主要化学成分。利用 TCMSP 数据库 (<https://www.tcmsp-e.com/>), 以口服生物利用度 $\geq 30\%$ 和类药性 ≥ 0.18 为标准, 筛选潜在的活性药效物质。同时, 通过 SwissADME 平台 (<https://swissadme.ch>) 预测, 对于同时满足胃肠吸收效率为 “high”、类药性参数中至少有 5 个 “yes” 的化合物纳入活性成分范畴。取 2 个数据平台筛选结果的合集作为 LC-EVLP 的有效成分。共筛选出 69 个候选活性成分。随后, 利用 SwissTargetPrediction 数据库 (<https://swisstargetprediction.ch>) 预测上述成分的作用靶点, 去除重复后, 共获得 901 个 LC-EVLP 潜在作用靶点。

2.7.3 自噬相关基因获取 为系统获取自噬相关基因, 整合 HADb 数据库 (<https://autophagy.lu/v1/>) 及 GeneCards 数据库 (<https://www.genecards.org/>) 中以 “autophagy” 为关键词筛选的前 500 个高相关性基因。合并两者基因集并去重, 构建最终自噬相关基因集合。

2.7.4 肝癌差异表达基因 (differentially expressed genes, DEGs) 筛选 在 GEO 数据库 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>) 中, 以 “liver cancer” 为关键词, 检索获得肝癌基因表达谱的数据集 GSE36376 和 GSE60502, 经 $\log_2$ 转化校正, 箱式图及主成分分析 (principal components analysis, PCA) 评估其归一化及样本差异程度。采用 R 语言 “limma” 包对校正后的 GSE36376 和 GSE60502 转录组数据进行差异分析, 以 $P < 0.05$ 且 $|\log_2$ 差异倍数 (fold change, FC)| > 1 为条件, 筛选出肝癌 DEGs, 采用 “ggplot2” 包对差异分析结果以火山图形式进行可视化。

2.7.5 蛋白质-蛋白质相互作用 (protein-protein interaction, PPI) 网络与拓扑分析 为探讨 LC-EVLP 干预肝癌的分子机制, 通过 Venn 分析筛选其活性成分靶点、肝癌差异基因及自噬相关基因的交集, 共获得 12 个共同靶点。进一步构建 PPI 网络并进行拓扑分析, 发现有丝分裂原活化蛋白激酶 1 (mitogen-activated protein kinase 1, MAPK1)、丝裂原活化蛋白激酶激酶 1 (mitogen-activated protein kinase kinase 1, MAP2K1)、PDK1 及 PKM 等基因具有较高中心性, 可能为调控代谢-自噬轴的关键枢纽。

2.7.6 基因本体 (gene ontology, GO) 功能及京都基因与基因组百科全书 (Kyoto encyclopedia of genes and genomes, KEGG) 通路富集分析 基于 R 语言 (v4.2.1) 环境, 利用 clusterProfiler 软件包

(v4.4.4) 对筛选出的核心交集基因进行功能富集分析。首先调用 org.Hs.eg.db 注释库将人源 (Homo sapiens) 基因 Symbol 标准化转换为 Entrez ID。随后, 分别进行 GO 注释及 KEGG 信号通路分析。采用 Benjamini-Hochberg (BH) 方法对原始 P 值进行多重假设检验校正 (FDR 控制), 以校正后 $P < 0.05$ 作为筛选显著富集条目的阈值。

2.7.7 分子对接实验 利用 AutoDock Vina 软件对 LC-EVLP 关键活性成分 (木犀草素、高车前素) 与核心靶点 [MAPK1、MAP2K1、PKM、热休克蛋白 90 α 家族 B 类成员 1 (heat shock protein 90 α family class B member 1, HSP90AB1)] 进行分子对接。通过 PubChem 数据库下载配体结构, RCSB PDB 数据库下载蛋白晶体结构。经去水、加氢及电荷计算等预处理后, 设定活性口袋参数进行对接模拟。以结合能评价结合亲和力, 并利用 PyMOL 软件对最佳结合构象及氨基酸残基相互作用进行 3D 可视化展示。

2.8 TEM 观察细胞超微结构

收集经 LC-EVLP (25.00 $\mu\text{g/mL}$) 处理 24 h 的 Mahlavu 细胞, 经 2.5% 戊二醛前固定及 1% 锇酸后固定。样本经梯度乙醇脱水、环氧树脂包埋后, 制备超薄切片 (60~80 nm)。切片经醋酸铀-柠檬酸铅双重染色后, 置于 TEM 下观察细胞质内双层膜自噬空泡及线粒体等细胞器的超微结构改变, 并采集图像。

2.9 Western blotting 检测细胞 LC3B、p62、Beclin 1、PKM、PDK1 和 GLS1 蛋白表达

设置对照组和 LC-EVLP (6.25、12.50、25.00 $\mu\text{g/mL}$) 组, 各给药组加入不同质量浓度的 LC-EVLP 处理 24 h, 对照组加入不含药物的培养基。收集细胞, 加入含抑制剂的 RIPA 裂解液裂解, 4 $^{\circ}\text{C}$ 、12 000 r/min 离心 15 min, 取上清, BCA 法测定蛋白浓度并统一定量。取 20 μg 蛋白加入上样缓冲液, 100 $^{\circ}\text{C}$ 加热 10 min 使蛋白变性, 经 8%~20% SDS-PAGE 分离并转膜至 PVDF 膜。封闭后加入 LC3B (1:10 000)、p62 (1:20 000)、Beclin 1 (1:2 000)、 β -actin (1:20 000)、PKM (1:2 000)、PDK1 (1:3 000)、GLS1 (1:3 000), 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜; TBST 洗涤后, 加入 HRP 标记的二抗 (1:10 000), 室温孵育 1 h。洗膜后采用 ECL 显色, 并用成像系统获取蛋白条带图像。

设置对照组、LC-EVLP (25 $\mu\text{g/mL}$) 组、BafA1

(100 nmol/L) 组和 LC-EVLP+Baf A1 组, 细胞给予 Baf A1 预处理 2 h, 对照组和 LC-EVLP 组加入等体积 DMSO 同步预处理 2 h。预处理结束, 对照组和 Baf A1 更换为新鲜完全培养基, LC-EVLP 组和 LC-EVLP+Baf A1 组更换为含 LC-EVLP 的培养基共孵育 24 h。收集细胞, 提取总蛋白, 检测相关蛋白表达。

设置对照组、LC-EVLP (25 μ g/mL) 组、DCA (5 mmol/L) 组和 LC-EVLP+ α -KG (2 mmol/L) 组, 细胞给予 DCA 或 α -KG 预处理 2 h, 对照组和 LC-EVLP 组加入等体积 DMSO 同步预处理 2 h。预处理结束, 对照组和 DCA 更换为新鲜完全培养基, LC-EVLP 组和 LC-EVLP+ α -KG 组更换为含 LC-EVLP 的培养基共孵育 24 h。收集细胞, 提取总蛋白, 检测相关蛋白表达。

2.10 LysoTracker 染色

设置对照组、LC-EVLP (25 μ g/mL) 组、Baf A1 (100 nmol/L) 组和 LC-EVLP+Baf A1 组, 细胞给予 Baf A1 预处理 2 h, 对照组和 LC-EVLP 组加入等体积 DMSO 同步预处理 2 h。预处理结束, 对照组和 Baf A1 更换为新鲜完全培养基, LC-EVLP 组和 LC-EVLP+Baf A1 组更换为含 LC-EVLP 的培养基共孵育 24 h。处理结束后, 弃去培养基, PBS 缓冲液轻柔清洗细胞 3 次。加入预先配制好的 LysoTracker Red 工作液, 于 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 条件下避光孵育 30 min。孵育结束后, 弃去染液, PBS 洗涤细胞 3 次, 以去除未结合的荧光染料。随后加入适量新鲜完全培养基, 于荧光显微镜下观察并拍摄荧光图像。

2.11 动物实验

2.11.1 造模、分组与给药 6 周龄雄性 BALB/c 裸鼠于右侧腋下皮下接种 1×10^7 个 Mahlavu 细胞, 待瘤体生长至 50~100 mm³ 时, 依据肿瘤体积采用随机区组法将裸鼠分为对照组及 LC-EVLP 低、中、高剂量 (10、20、40 mg/kg, 以总蛋白量计) 组和索拉非尼 (30 mg/kg) 组, 每组 5 只。各给药组 ig 相应药物, 对照组 ig 等体积的 PBS 缓冲液, 1 次/d, 连续干预 15 d。给药期间同步监测裸鼠状态及肿瘤生长情况。

2.11.2 体质量和肿瘤体积的测定 使用电子天平和游标卡尺分别于给药后第 0、3、6、9、12、15 天记录裸鼠体质量及肿瘤生长情况, 测量肿瘤长径和短径, 计算肿瘤体积。给药后第 15 天处死动物, 剥

离瘤体并拍照, 记录肿瘤质量。

肿瘤体积=(长径 $\times$ 短径²)/2

2.11.3 Western blotting 检测肿瘤组织 LC3B、p62、Beclin 1 蛋白表达 取 50 mg 肿瘤组织, 加入含抑制剂的 RIPA 裂解液裂解, 组织经匀浆后于 4 $^{\circ}$ C、12 000 r/min 离心 15 min, 取上清, BCA 法测定蛋白浓度。按“2.9”项下方法检测 LC3B、p62、Beclin 1 蛋白表达。

2.11.4 苏木素-伊红 (hematoxylin-eosin, HE) 染色 实验终点收集各组小鼠瘤体及心、肝、肺、肾组织, 生理盐水冲洗后以 4% 多聚甲醛固定 24 h。经梯度脱水、透明及石蜡包埋后制备 4 μ m 切片。切片脱蜡复水后进行 HE 染色, 随后脱水、透明并封片, 在光学显微镜下观察组织病理形态并采集图像。

2.11.5 免疫组化检测肿瘤组织 Ki67 和 PCNA 表达 取肿瘤组织石蜡切片 (4 μ m), 脱蜡复水后进行抗原修复, 3% 过氧化氢处理并用 5% BSA 封闭。加入 Ki67 (1:500)、PCNA (1:200) 一抗, 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜; PBS 洗涤后, 加入 HRP 标记的二抗, DAB 显色, 苏木素复染。切片脱水封片后, 于显微镜下观察并拍照, 计算阳性细胞比例。

2.11.6 免疫荧光检测肿瘤组织 LC3B 和 p62 表达 取肿瘤组织石蜡切片 (4 μ m), 脱蜡复水后进行抗原修复。经 0.1% Triton X-100 透化 15 min, 5% BSA 封闭 1 h。加入 LC3B (1:500)、p62 (1:500) 一抗, 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜; PBS 洗涤后, 加入 Cy3、AF488 荧光标记的二抗 (1:500), 室温孵育 1 h。DAPI 染色后封片, 在荧光显微镜下观察并采集图像。

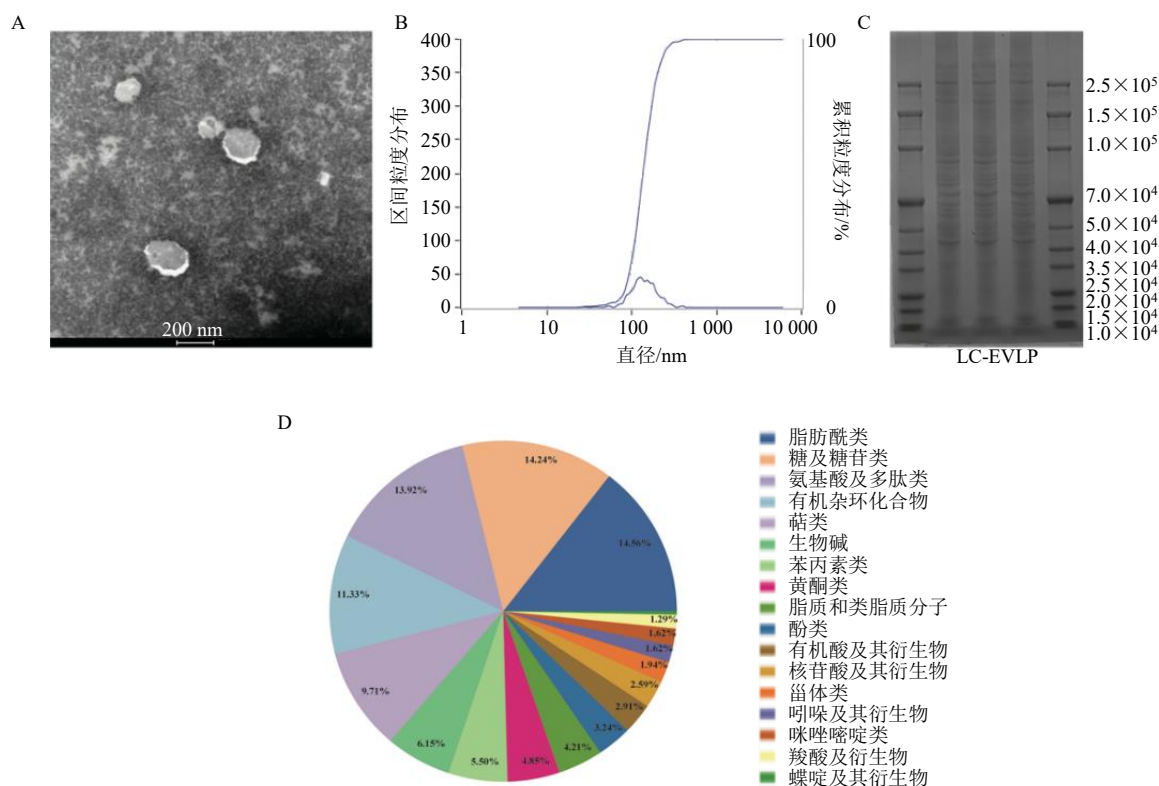
2.12 统计学分析

实验数据均采用 SPSS 25.0 软件进行处理与分析。计量资料首先进行正态性检验及方差齐性检验, 符合正态分布的数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。对于满足正态分布且方差齐性的数据, 采用单因素方差分析 (One-way ANOVA), 组间两两比较采用最小显著差异法 (least significant difference, LSD) 法; 对于符合正态分布但方差不齐的数据, 采用 Welch 检验进行校正分析; 对于不符合正态分布的数据, 则采用 Kruskal-Wallis 非参数检验。

3 结果

3.1 LC-EVLP 的表征和摄取

3.1.1 LC-EVLP 的表征 TEM 结果 (图 1-A) 显示, 分离纯化后的 LC-EVLP 呈现出典型的茶托状或圆形囊泡结构, 膜边界清晰且分散性良好。NTA



A-TEM 观察 LC-EVLP 形态 ($\times 10,000$); B-LC-EVLP 粒径分布曲线; C-LC-EVLP 总蛋白的 SDS-PAGE 电泳图谱; D-LC-EVLP 成分类别数量分布。

A-morphology of LC-EVLP observed by TEM ($\times 10,000$); B-particle size distribution curve of LC-EVLP; C-SDS-PAGE electrophoretic profile of total proteins from LC-EVLP; D-distribution of component categories in LC-EVLP.

图 1 LC-EVLP 表征与成分分类

Fig. 1 Characterization and component classification of LC-EVLP

结果 (图 1-B) 进一步证实了其均一性, LC-EVLP 的水合粒径主要分布在 126.0~151.7 nm (主峰占比 51.5%), 与 TEM 观察到的尺寸范围一致。上述物理表征结果表明成功提取了结构完整且粒径均一的纳米级囊泡。

SDS-PAGE 凝胶电泳结果 (图 1-C) 显示, LC-EVLP 具有丰富的蛋白条带分布, 且条带清晰、连续, 表明囊泡中的蛋白质在提取过程中保持了良好的完整性。为了明确 LC-EVLP 的物质基础, 进一步对其化学成分进行定量分析。结果如图 1-D 所示, LC-EVLP 由多种化合物组成, 其中脂质 (14.56%)、糖及糖苷类 (14.24%) 和氨基酸 (13.92%) 是丰度最高的 3 大类成分, 这与其作为生物膜结构的特性相符。此外, 半边莲特有的药效活性成分在囊泡中均有检出^[20], 包括有机杂环化合物 (11.33%)、萜类 (9.71%)、生物碱 (6.15%) 及黄酮类 (4.85%)。

3.1.2 LC-EVLP 在 Mahlavu 细胞中的摄取 如图 2

所示, 经 DAPI (核定位) 与 FITC-鬼笔环肽 (骨架定位) 复染, 对照组细胞仅显示特征性的蓝色与绿色荧光, 证实无自发荧光干扰。LC-EVLP 组在细胞质区域展现出密集红色点状荧光分布, 表明 LC-EVLP 能够被 Mahlavu 细胞有效识别进入胞内。

3.2 LC-EVLP 对肝癌细胞的抑制作用及体外安全性评价

3.2.1 LC-EVLP 对 LO2 和 Mahlavu 细胞存活率的影响 如图 3 所示, LC-EVLP 对 Mahlavu 细胞的生长抑制呈现明显的剂量相关性, 其中 12.500~50.000 $\mu\text{g/mL}$ 的 LC-EVLP 干预 Mahlavu 细胞 24、48 h, 细胞存活率显著降低 ($P < 0.001$)。1.560~50.000 $\mu\text{g/mL}$ 的 LC-EVLP 干预 24、48 h, 对 LO2 正常肝细胞存活率无明显影响。在本研究实验条件下, LC-EVLP 对 Mahlavu 细胞与 LO2 细胞表现出不同程度的影响, 即在抑制肝癌细胞活力的同时对正常肝细胞的影响相对较小。

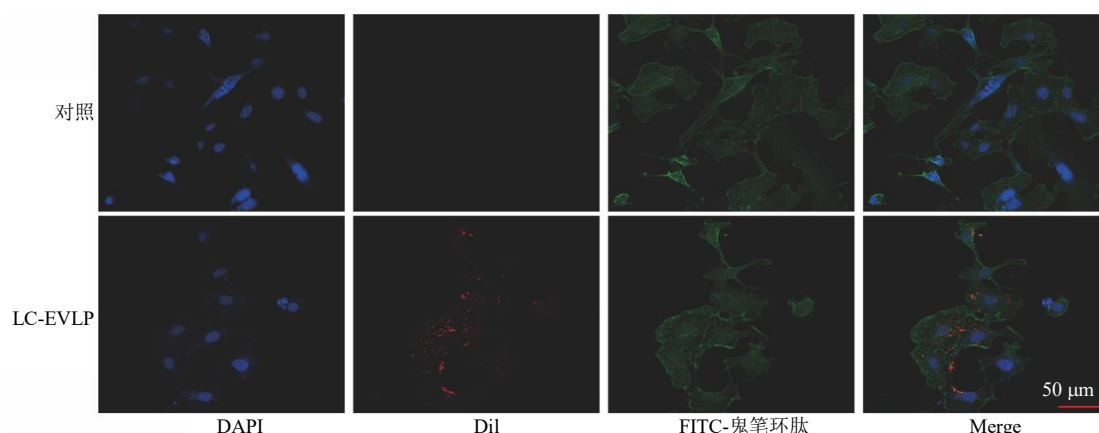
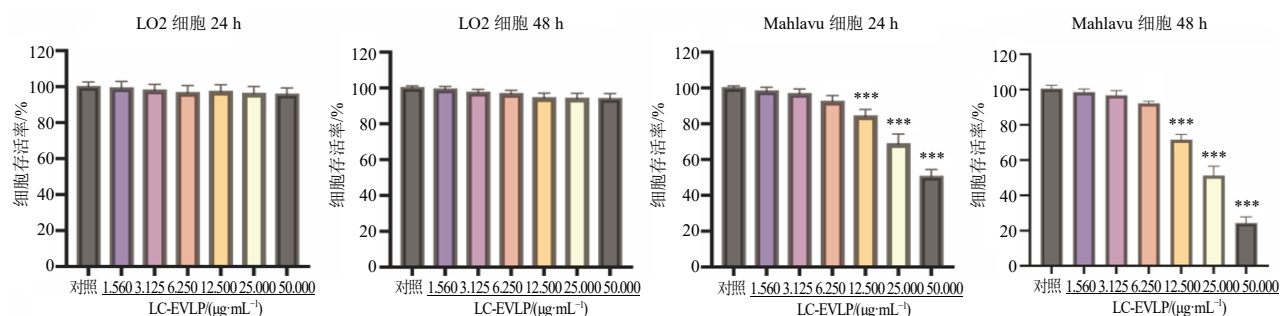


图 2 Mahlavu 细胞摄取 LC-EVLP ($\times 400$)

Fig. 2 Uptake of LC-EVLP by Mahlavu cells ($\times 400$)



与对照组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$, 图 4、5、10、14~16 同。

* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$ vs control group, same as figs. 4, 5, 10, 14~16.

图 3 不同质量浓度 LC-EVLP 对 LO2 和 Mahlavu 细胞存活率的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 3 Effects of LC-EVLP at different concentrations on survival rate of LO2 and Mahlavu cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

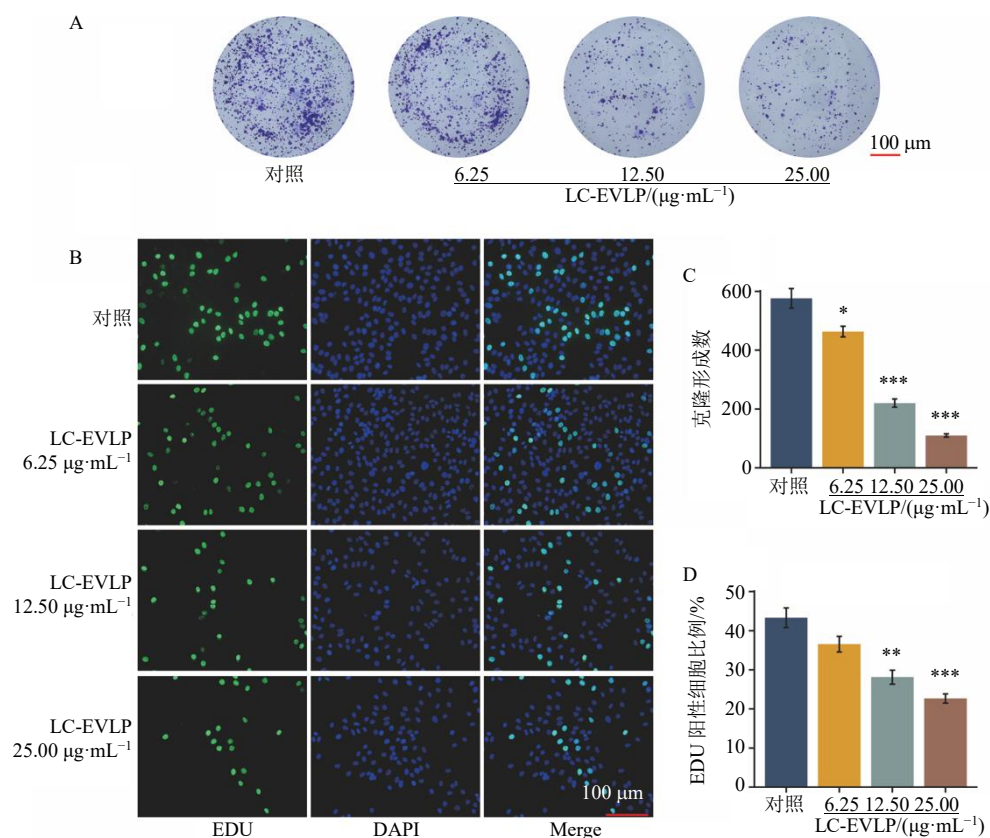
3.2.2 LC-EVLP 抑制 Mahlavu 细胞的体外增殖
基于 CCK-8 实验结果,进一步通过克隆形成实验和 EdU 实验验证 LC-EVLP 对细胞增殖的抑制作用。克隆形成实验结果(图 4-A、C)显示,LC-EVLP 显著抑制 Mahlavu 细胞的集落形成能力($P < 0.05$ 、 0.001),且呈剂量相关性。EdU 实验结果(图 4-B、D)显示,对照组细胞表现出高丰度的 EdU 阳性信号,提示活跃的 DNA 复制状态;LC-EVLP 组的荧光强度随给药浓度增加而衰减,其中 12.50、25.00 $\mu\text{g/mL}$ 组有统计学差异($P < 0.01$ 、 0.001)。以上结果表明,LC-EVLP 通过干扰 DNA 合成过程抑制 Mahlavu 细胞的恶性增殖。

3.2.3 LC-EVLP 抑制 Mahlavu 细胞的迁移和侵袭
划痕愈合实验结果(图 5-A、C)显示,对照组细胞在 24、48 h 内迅速闭合划痕间隙,呈现活跃迁移表型;LC-EVLP 组划痕愈合率呈时间和剂量相关性降低,其中 12.50、25.00 $\mu\text{g/mL}$ 组有统计学差异($P < 0.01$ 、 0.001),提示 LC-EVLP 有效削弱了细胞的横

向运动特性。Transwell 实验进一步观察细胞垂直穿越胞外基质的行为,如图 5-B、D 所示,对照组大量细胞穿过 Matrigel 基质附着于下室膜表面,LC-EVLP 组穿膜细胞密度呈剂量相关性降低($P < 0.05$ 、 0.001),证实 LC-EVLP 对 Mahlavu 细胞恶性侵袭行为的有效遏制。

3.3 基于网络药理学预测 LC-EVLP 诱导自噬与代谢重塑的潜在机制

3.3.1 LC-EVLP 干预靶点及其在肝癌患者中的表达
为明确 LC-EVLP 诱导的具体细胞死亡模式,采用多种特异性抑制剂进行挽救实验。CCK-8 结果(图 6-A)显示,自噬抑制剂 BafA1 显著回补了细胞存活率($P < 0.001$),而凋亡(Z-VAD-FMK)、铁死亡(Fer-1)及坏死性凋亡(Nec-1)抑制剂均未能逆转 LC-EVLP 造成的细胞活力下降。这一结果证实,自噬性细胞死亡是 LC-EVLP 发挥抗肝癌活性的主导方式。为进一步揭示其潜在分子机制,将 LC-EVLP 成分靶点、肝癌疾病靶点及自噬相关基因进

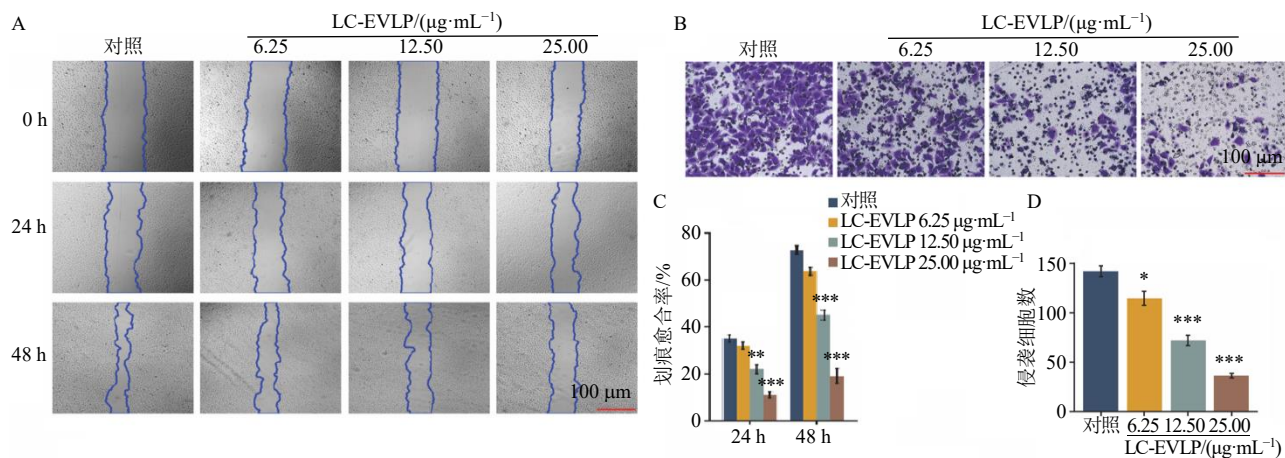


A-克隆形成实验; B-EdU 实验 ($\times 200$); C-克隆形成数目的定量统计; D-EdU 阳性细胞比例的定量统计。

A-colony formation assay; B-EdU assay ($\times 200$); C-quantitative analysis of colony numbers; D-quantitative analysis of proportion of EdU positive cells.

图 4 LC-EVLP 对 Mahlavu 细胞增殖的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 4 Effect of LC-EVLP on proliferation of Mahlavu cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)



A-划痕愈合实验 ($\times 50$); B-Transwell 侵袭实验 ($\times 100$); C-划痕愈合率的定量统计; D-Transwell 侵袭细胞数的定量统计。

A-wound healing assay ($\times 50$); B-Transwell invasion assay ($\times 100$); C-quantitative analysis of wound closure rate; D-quantitative analysis of number of invading cells in Transwell assay.

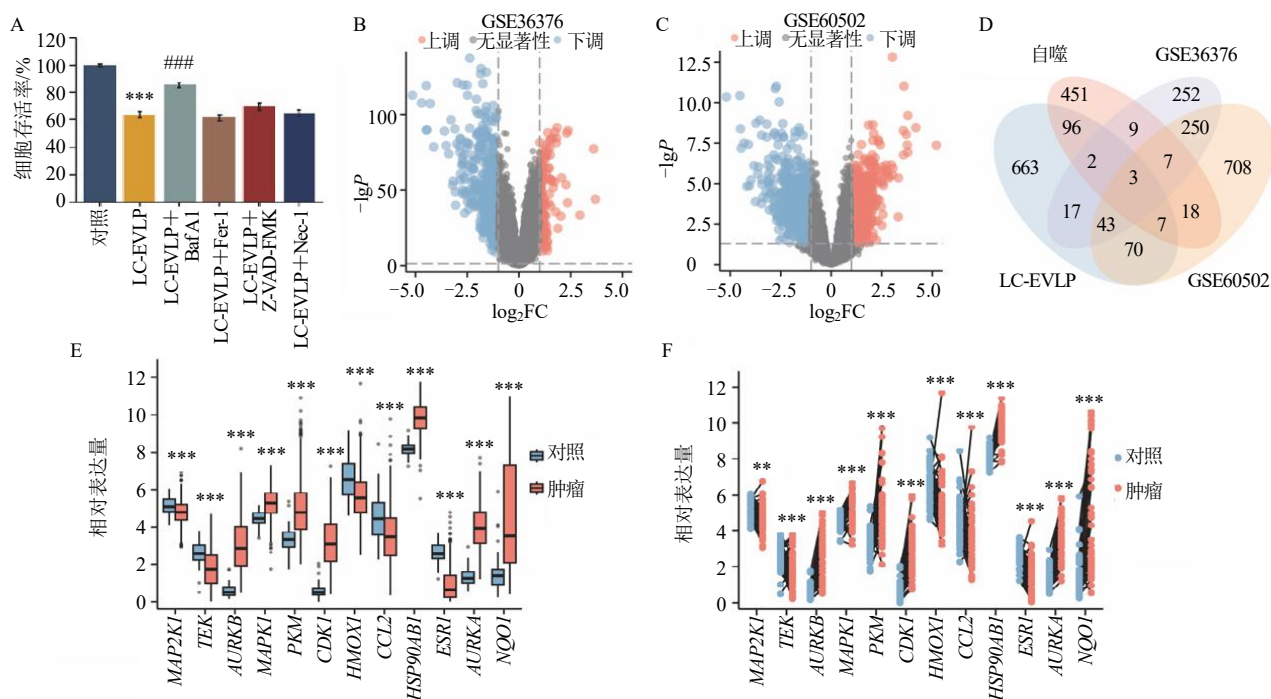
图 5 LC-EVLP 对 Mahlavu 细胞迁移和侵袭的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 5 Effects of LC-EVLP on migration and invasion of Mahlavu cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

行多维交集分析,以锁定介导该过程的核心靶点。

利用 SwissTargetPrediction 数据库检索并经过去重处理,获得 901 个 LC-EVLP 潜在作用靶点;综

合 HADB 与 GeneCards 数据库资源,构建了包含 595 个基因的非冗余自噬相关基因集。针对肝癌 GEO 数据集的 DEGs 分析显示,GSE36376 数据集



A-抑制剂挽救实验; B、C-GEO 数据集 GSE36376 与 GSE60502 中肝癌与正常组织的 DEGs 火山图; D-Venn 图; E-LC-EVLP 干预靶点在肝癌患者中的非配对表达分析; F-LC-EVLP 干预靶点在肝癌患者中的配对表达分析; 与对照组比较: ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$; 与 LC-EVLP 组比较: #### $P < 0.001$ 。A-inhibitor rescue experiment; B, C-volcano plots of DEGs between hepatocellular carcinoma and normal tissues in GEO datasets GSE36376 and GSE60502; D-Venn diagram; E-unpaired expression analysis of LC-EVLP target genes in hepatocellular carcinoma patients; F-paired expression analysis of LC-EVLP target genes in hepatocellular carcinoma patients; ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$ vs control group; #### $P < 0.001$ vs LC-EVLP group.

图 6 LC-EVLP 干预靶点及其在肝癌患者中的表达 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 6 Targets of LC-EVLP and their expression in liver cancer patients ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

中包含 583 个 DEGs, 其中上调基因 125 个, 下调基因 458 个 (图 6-B); GSE60502 数据集则鉴定出 1 106 个 DEGs, 其中上调基因 488 个, 下调基因 618 个 (图 6-C)。经多维韦恩图交叉筛选, 最终锁定酪氨酸激酶受体 TEK (TEK receptor tyrosine kinase, TEK)、极光激酶 B (aurora kinase B, AURKB)、MAPK1、PKM、细胞周期蛋白依赖性激酶 1 (cyclin-dependent kinase 1, CDK1)、血红素加氧酶 1 (heme oxygenase 1, HMOX1)、C-C 基序趋化因子配体 2 (C-C motif chemokine ligand 2, CCL2)、MAP2K1、HSP90AB1、雌激素受体 1 (estrogen receptor 1, ESR1)、AURKA 及 NAD(P)H 醌氧化还原酶 1 [NAD(P)H quinone dehydrogenase 1, NQO1] 共 12 个 LC-EVLP 干预肝癌自噬的关键靶点 (图 6-D)。进一步基于 TCGA-LIHC 队列的配对/非配对样本 t 检验验证证实, 上述 12 个基因在肝癌组织与癌旁组织间的表达水平差异均具有显著统计学意义 ($P < 0.01$ 、0.001, 图 6-E、F)。

3.3.2 LC-EVLP 干预靶点的网络药理学及分子对接研究 为阐明筛选出的 12 个关键交集基因 (图

7-A) 的生物学功能, 基于 DAVID 数据库进行 GO 功能注释及 KEGG 通路富集分析, 结果见图 7-B。GO 生物学过程 (biological process, BP) 分析显示, DEGs 显著富集于维持细胞能量稳态相关的条目, 包括三磷酸腺苷 (adenosine triphosphate, ATP) 代谢过程及营养水平响应。鉴于营养匮乏与能量应激是诱导细胞自噬发生的典型微环境特征, 这一结果提示上述靶点在细胞自噬启动过程中可能发挥关键作用。KEGG 信号通路分析进一步揭示了潜在的分子机制。结果显示, 除缺氧诱导因子-1 (hypoxia-inducible factor-1, HIF-1)、磷脂酰肌醇 3-激酶 (phosphatidylinositol 3-kinase, PI3K)-蛋白激酶 B (protein kinase B, Akt) 等经典肿瘤信号通路外, 癌症中心碳代谢呈现极显著富集 ($P < 0.001$)。结合 PPI 网络拓扑结构分析, PKM 被鉴定为该通路中的核心节点。综合 GO 分析中对 ATP 代谢的富集以及 KEGG 分析中中心碳代谢的显著性, LC-EVLP 可能通过靶向以 PKM 为核心的代谢网络, 重塑肿瘤细胞的能量供给与生物合成通量 (特别是谷氨酰胺代谢), 进而诱导自噬。

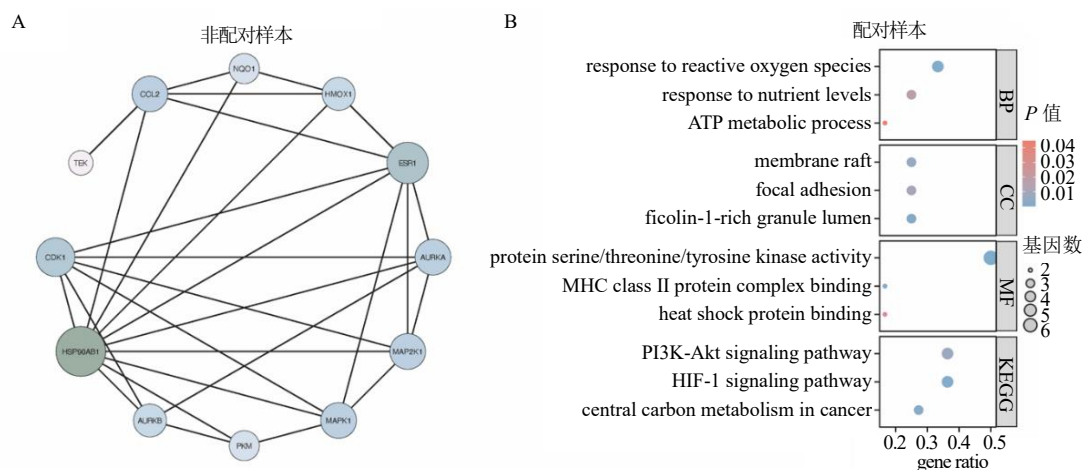


图 7 DEGs 的 PPI 网络 (A) 及功能富集分析 (B)

Fig. 7 PPI network (A) and functional enrichment analysis (B) of DEGs

网络药理学筛选共获得 69 个 LC-EVLP 候选活性成分, 对其化学类别进行统计分析发现, 候选成分中以黄酮类化合物为主。进一步结合 LC-MS 半定量结果对关键小分子的相对丰度进行分析, 发现代表性黄酮类化合物木犀草素、高车前素在 LC-EVLP 中均具有可检测且相对较高的丰度, 其峰面积占比在已鉴定成分中处于较高水平。本研究选取木犀草素、高车前素作为代表性活性成分用于分子对接研究。

分子对接分析从结构层面进一步评估了 LC-EVLP 候选小分子配体与关键靶蛋白之间的潜在相

互作用关系, 如图 8 所示, 筛选得到的主要小分子配体均可与核心靶蛋白 PKM、MAPK1、MAP2K1 及 HSP90AB1 形成稳定结合。部分活性成分能够进入 PKM 的活性口袋并形成氢键, 同时在 MAPK1/MAP2K1 等信号分子以及分子伴侣蛋白 HSP90AB1 上亦表现出一定的结合亲和力。从整体结合能力来看, 各小分子配体与靶蛋白的结合能分布在 $-4.72 \sim -5.97$ kcal/mol ($1 \text{ kcal/mol} = 4.182 \text{ kJ/mol}$), 提示其具有中等程度的结合稳定性。具体分析显示, 木犀草素与 HSP90AB1、MAP2K1、MAPK1 及 PKM 的结合能分别为 -5.69 、 -5.97 、 -5.47

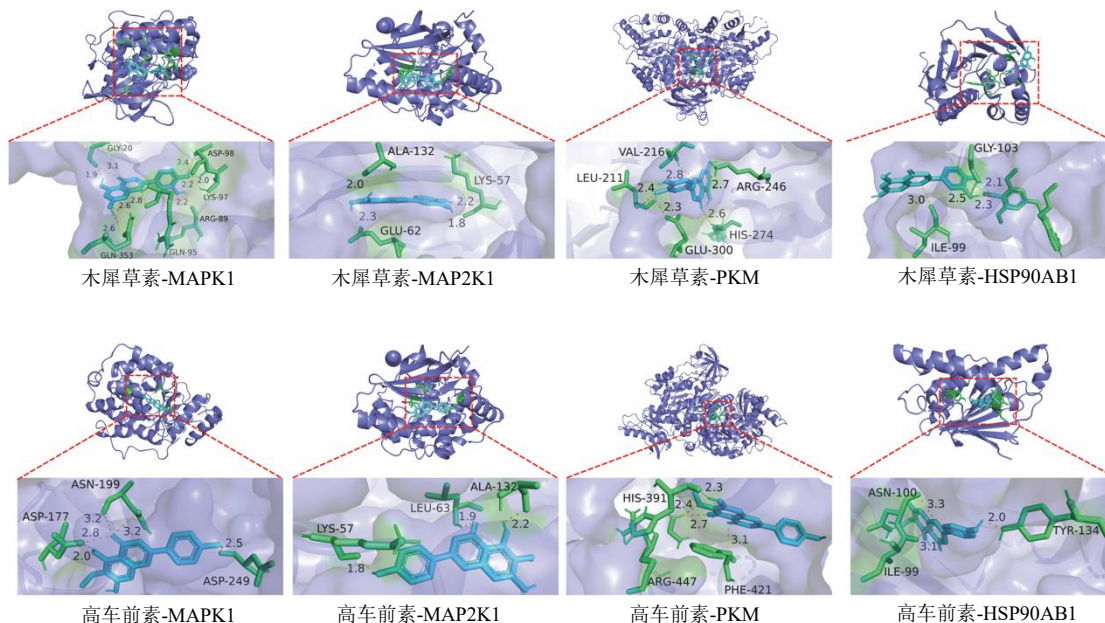


图 8 分子对接结果

Fig. 8 Molecular docking results

和 -5.66 kcal/mol, 表现出相对较强的结合能力; 而高车前素与上述靶蛋白的结合能分别为 -4.72 、 -5.57 、 -5.14 、 -4.93 kcal/mol, 亦提示其具备一定的结合活性。相互作用模式分析表明, 这些配体不仅能够与靶蛋白形成氢键, 还可通过疏水相互作用等非共价作用增强配体-受体复合物的稳定性。

综合分子对接结果与网络药理学筛选结果可以发现, 二者在关键靶点层面具有一致性, 提示所筛选的小分子配体可能参与 LC-EVLP 相关生物学效应的调控过程。LC-EVLP 中的活性成分可能通过多靶点协同作用机制, 作用于 PKM 及 MAPK 信号通路相关蛋白, 并结合分子伴侣蛋白 HSP90AB1, 从而参与调控谷氨酰胺代谢及自噬相关信号通路。

3.4 LC-EVLP 诱导肝癌细胞自噬的实验验证

3.4.1 LC-EVLP 诱导肝癌细胞自噬的超微结构观察

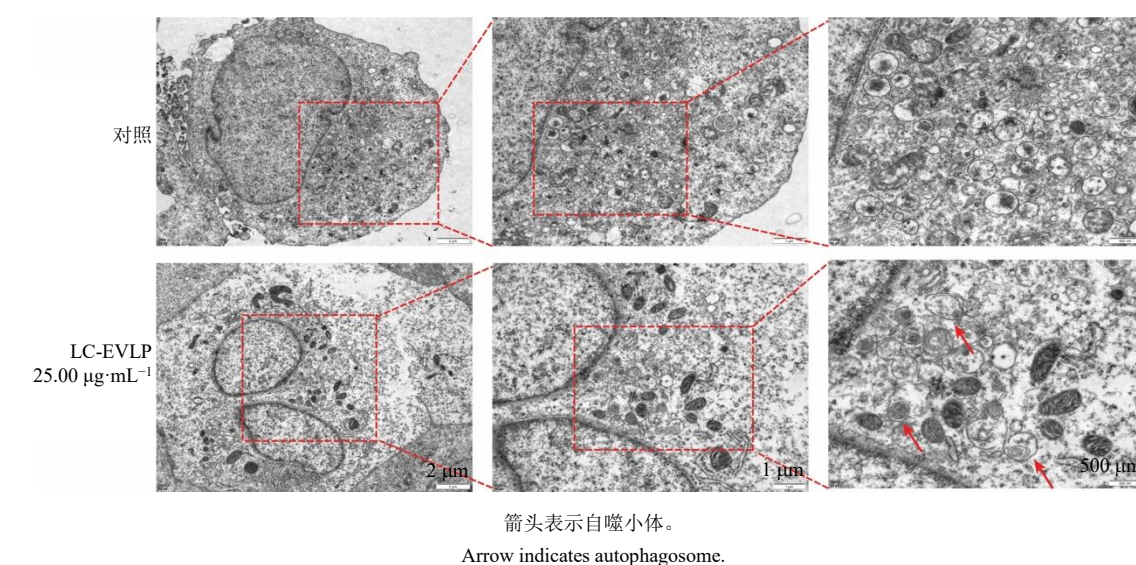


图 9 TEM 观察 LC-EVLP 诱导 Mahlavu 细胞自噬 ($\times 10\,000$)

Fig. 9 LC-EVLP induced autophagy in Mahlavu cells observed by TEM ($\times 10\,000$)

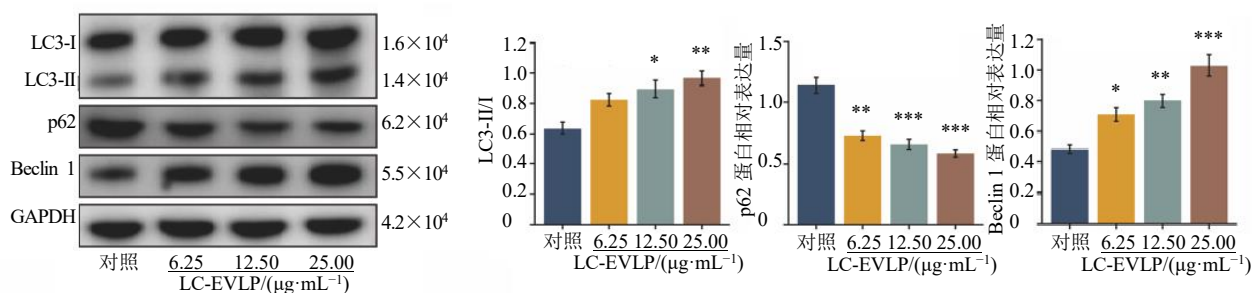


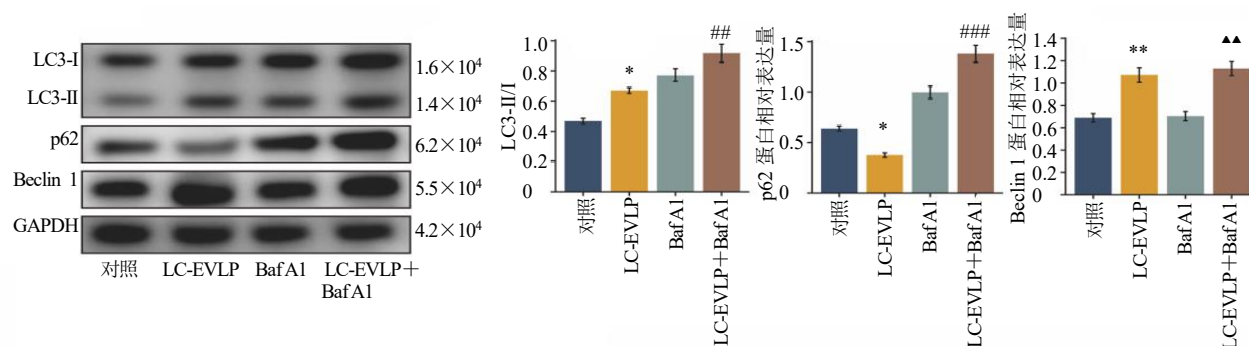
图 10 LC-EVLP 对 Mahlavu 细胞自噬相关蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 10 Effect of LC-EVLP on expressions of autophagy-related proteins in Mahlavu cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

3.4.3 自噬流阻断实验证实 LC-EVLP 促进自噬通畅性 为进一步鉴别 LC-EVLP 引起的自噬小体聚集是源于自噬启动的增强还是溶酶体降解途径的阻滞,利用晚期自噬抑制剂 BafA1 进行自噬流检测实验。如图 11 所示,与对照组比较,单独 LC-EVLP 处理组显著上调自噬起始关键蛋白 Beclin 1 的表达 ($P<0.01$),并伴随 LC3-II/I 值的升高及 p62 表达水平的降低 ($P<0.05$),证实了自噬信号的上游启动与下游激活。进一步引入溶酶体抑制剂 BafA1 后,LC-EVLP+BafA1 组 LC3-II/I 值进一步累积 ($P<0.01$),表明 LC-EVLP 诱导的自噬小体合成速率超过了溶酶体的基础降解负荷,证实 LC-EVLP 主要作用于增强自噬的生成阶段。此外,BafA1 显著逆转 LC-EVLP 对 p62 表达的抑制作用 ($P<0.001$),

进一步印证了自噬流的完整性。抑制剂介导的挽救效应提示自噬末端降解过程未受到明显阻滞。结合 Beclin 1 表达上调的结果,LC-EVLP 可能在肝癌细胞中促进自噬的启动,并支持自噬流的进行。

为进一步验证溶酶体活性,利用 LysoTracker Red 探针在有无 BafA1 的条件下评估了溶酶体酸化状态,如图 12 所示,与对照组比较,LC-EVLP 组细胞内红色荧光强度显著升高 ($P<0.001$),提示溶酶体酸化活跃。相反,BafA1 的处理显著抑制了荧光强度 ($P<0.001$)。而 BafA1 有效逆转了 LC-EVLP 诱导的荧光强度升高 ($P<0.001$)。这一结果与 Western blotting 中 p62 的变化趋势相互印证,证明了 LC-EVLP 诱导的自噬流依赖于功能性溶酶体的酸性微环境。



与对照组比较: * $P<0.05$ ** $P<0.01$ *** $P<0.001$; 与 LC-EVLP 组比较: ## $P<0.01$ ### $P<0.001$; 与 BafA1 组比较: ** $P<0.01$ *** $P<0.001$; 图 12、13 同。
* $P<0.05$ ** $P<0.01$ *** $P<0.001$ vs control group; ## $P<0.01$ ### $P<0.001$ vs LC-EVLP group; ** $P<0.01$ *** $P<0.001$ vs BafA1 group, same as figs. 12, 13.

图 11 自噬流阻断实验验证 LC-EVLP 促进自噬通畅性 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Fig. 11 Verification of LC-EVLP-promoted autophagic flux using an autophagy blockade assay ($\bar{x} \pm s, n=3$)

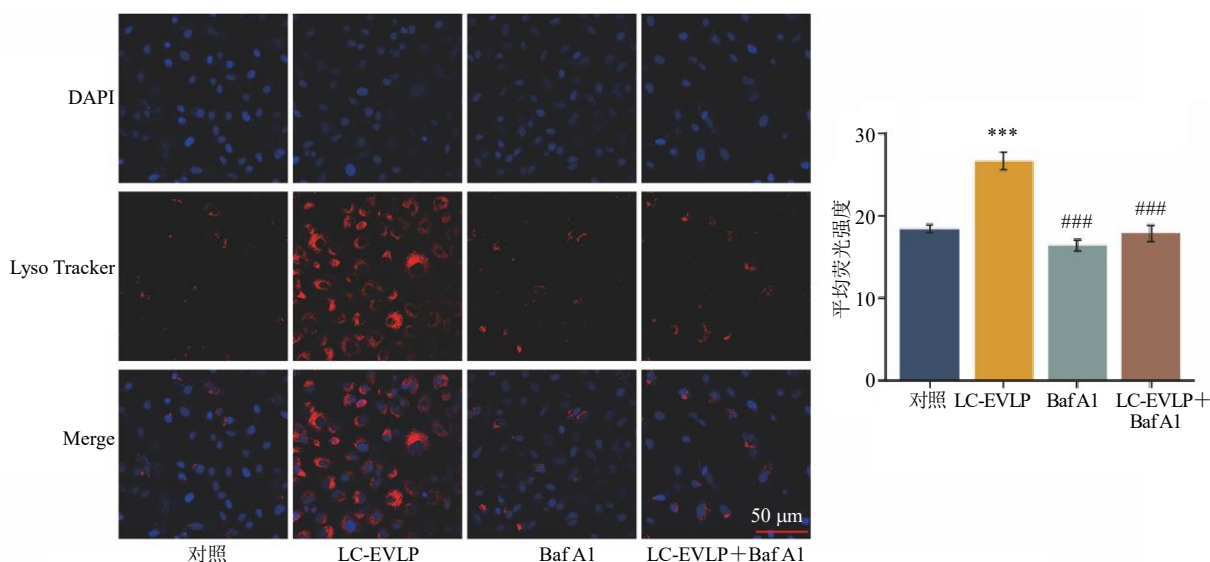


图 12 LC-EVLP 促进溶酶体活性并增强自噬流通畅性 ($\times 400; \bar{x} \pm s, n=3$)

Fig. 12 LC-EVLP promotes lysosomal activity and enhances autophagic flux ($\times 400; \bar{x} \pm s, n=3$)

3.5 LC-EVLP 通过调控 PDK1/PKM 重塑谷氨酰胺代谢

为阐明 LC-EVLP 诱导的细胞死亡是否由 PDK1/PKM 介导的代谢重编程驱动,通过 Western blotting 检测了糖与谷氨酰胺代谢关键酶的表达变化。结果如图 13 所示,LC-EVLP 处理降低了 PDK1 和 PKM 的蛋白表达水平 ($P < 0.01$ 、 0.001)。进一步以 PDK1 特异性抑制剂 DCA 作为干预手段,发现抑制 DCA 不仅降低了 PDK1 和 PKM 的表达 ($P < 0.01$ 、 0.001),同时伴随谷氨酰胺酶 GLS1 表达的下降 ($P < 0.001$),提示 PDK1 可能参与对 GLS1 的调控。与 DCA 处理一致,LC-EVLP 同样降低了 GLS1 的表达水平 ($P < 0.001$),提示其可能通过影响

PDK1-GLS1 相关代谢轴,对糖酵解及谷氨酰胺代谢产生协同调节作用。

上述代谢受限状态伴随自噬反应的增强。与对照组比较,LC-EVLP 及 DCA 处理均表现为自噬标志物 LC3-II/I 值的升高及底物 p62 表达的降低 ($P < 0.01$ 、 0.001)。为进一步探讨代谢产物变化在其中的作用,引入 α -KG 进行回补实验,结果显示,外源性补充 α -KG 未明显恢复上游代谢酶(PDK1、PKM、GLS1)的表达状态,但可在一定程度上纠正自噬相关指标的变化,使 LC3-II/I 值和 p62 表达接近对照组 ($P < 0.01$)。以上结果提示,LC-EVLP 诱导的代谢改变,尤其是与 α -KG 相关的代谢失衡,可能参与自噬增强过程的调控。

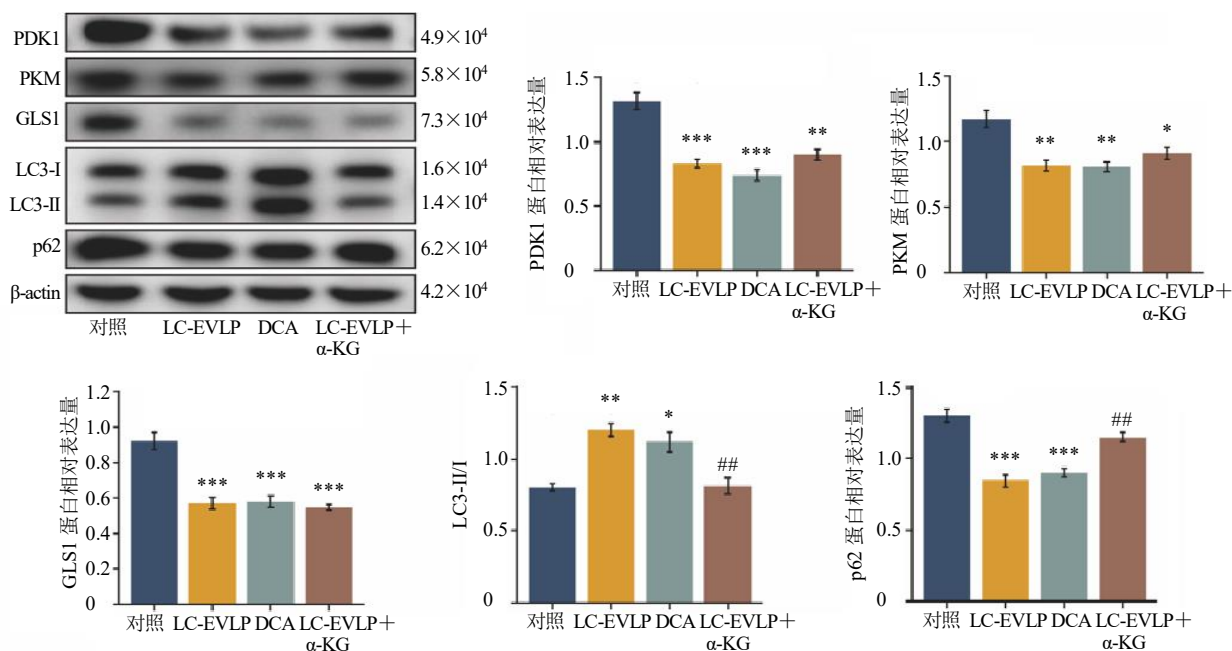


图 13 LC-EVLP 通过调控 PDK1/PKM 重塑谷氨酰胺代谢 ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

Fig. 13 LC-EVLP reprograms glutamine metabolism by regulating PDK1/PKM ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

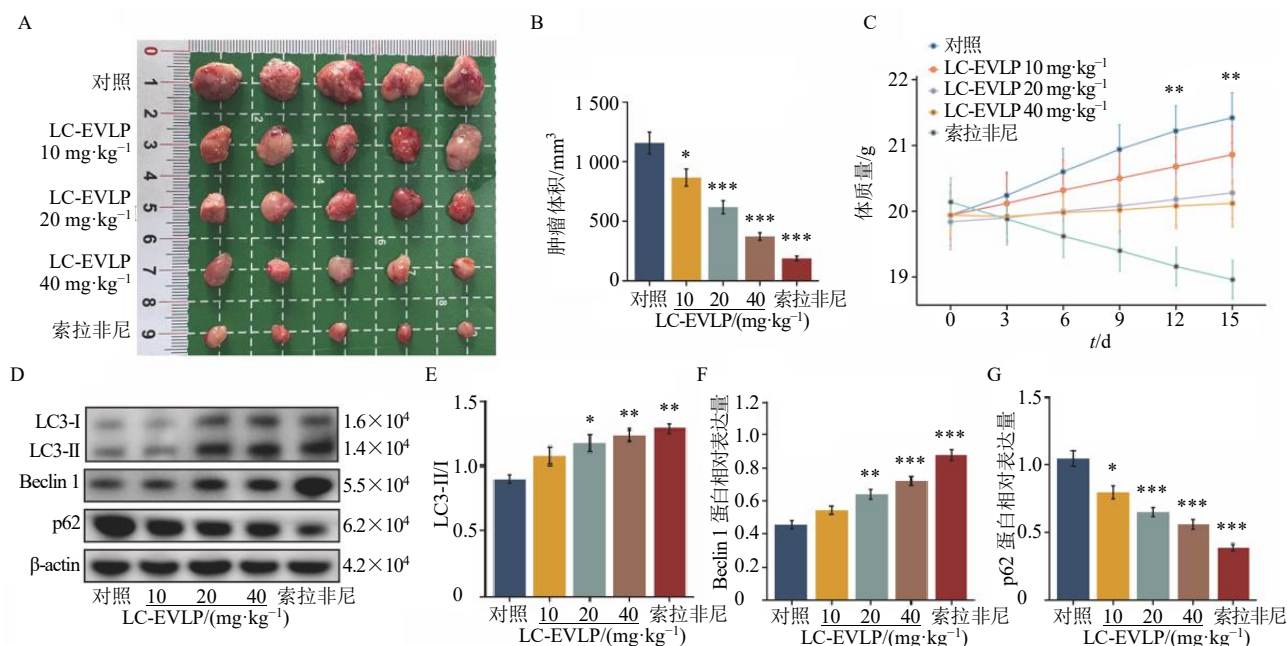
3.6 体内抗肿瘤药效及系统安全性评价

为了评估 LC-EVLP 的体内抗肿瘤活性,构建皮下荷瘤小鼠模型,并给予 LC-EVLP 和索拉非尼干预。如图 14-A、B 所示,与对照组比较,各给药组离体肿瘤体积均有所减小 ($P < 0.001$)。如图 14-C 所示,LC-EVLP 未引起小鼠体质量降低,而索拉非尼组小鼠体质量显著降低 ($P < 0.01$)。表明 LC-EVLP 在一定剂量范围内对肝癌异种移植瘤的生长具有抑制作用。

为进一步探讨 LC-EVLP 体内抗肿瘤的作用机制,采用 Western blotting 检测肿瘤组织中自噬相关蛋白表达,如图 14-D~G 所示,与对照组比较,LC-

EVLP 中、高剂量组和索拉非尼组肿瘤组织 LC3-II/I 值和 Beclin 1 表达水平显著升高 ($P < 0.05$ 、 0.01 、 0.001),各给药组肿瘤组织自噬底物 p62 蛋白表达显著降低 ($P < 0.05$ 、 0.001)。提示 LC-EVLP 抗肿瘤的作用机制可能与肿瘤组织中自噬相关过程的增强有关。

HE 染色结果(图 15-A)显示,对照组肿瘤组织结构紧密,肿瘤细胞排列有序,细胞核大且深染,表现出旺盛的生长状态。与对照组比较,LC-EVLP 组表现出明显的病理损伤特征,随着给药剂量的增加,肿瘤组织内细胞密度逐渐降低,可见核固缩、核碎裂及大面积的组织坏死区域,其中 LC-EVLP 高

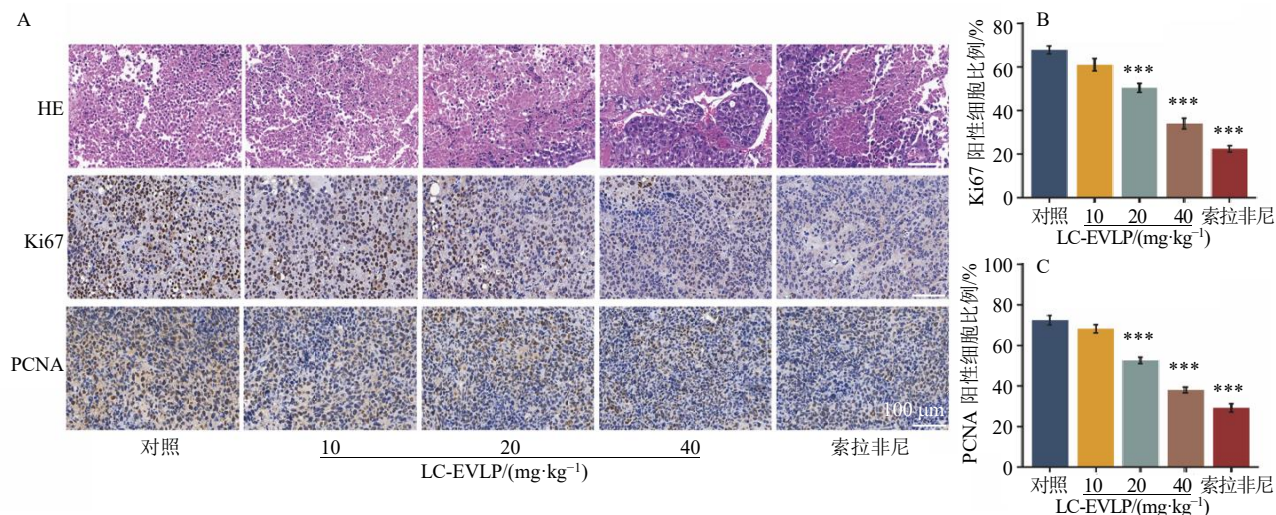


A-各组肿瘤形态; B-各组肿瘤体积; C-各组小鼠体重变化; D~G-移植瘤组织自噬相关蛋白表达。

A-tumor morphology of each group; B-tumor volume of each group; C-changes in body weight of mice in each group; D—G-expression of autophagy related proteins in transplanted tumor tissues.

图 14 LC-EVLP 对裸鼠肝癌皮下瘤的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

Fig. 14 Effects of LC-EVLP on subcutaneous liver cancer xenografts in nude mice ($\bar{x} \pm s, n = 5$)



A-肿瘤组织的 HE 染色及 Ki67、PCNA 免疫组化染色代表性图像; B-Ki67 阳性细胞比例的定量统计; C-PCNA 阳性细胞比例的定量统计。

A-representative images of H&E staining and immunohistochemistry for Ki67 and PCNA in tumor tissues; B-quantitative analysis of proportion of Ki67 positive cells; C-quantitative analysis of proportion of PCNA positive cells.

图 15 LC-EVLP 抑制裸鼠肝癌皮下瘤增殖 ($\times 100; \bar{x} \pm s, n = 5$)

Fig. 15 LC-EVLP inhibits growth of subcutaneous liver cancer xenografts in nude mice ($\times 100; \bar{x} \pm s, n = 5$)

剂量组的组织形态破坏程度最为严重,与索拉非尼组的病理表现相似。

免疫组化分析进一步证实了 LC-EVLP 对肿瘤细胞增殖的抑制作用。如图 15-A 所示, Ki67 与 PCNA 作为细胞增殖的关键核抗原,在对照组肿瘤

组织中呈强阳性表达;经 LC-EVLP 处理后,肿瘤组织中 Ki67 和 PCNA 的阳性着色细胞数呈剂量相关性减少。定量统计分析(图 15-B、C)显示, LC-EVLP 中、高剂量组和索拉非尼组 Ki67 及 PCNA 阳性细胞比例均较对照组显著降低 ($P < 0.001$)。

如图 16 所示, 对照组细胞中 LC3B 荧光信号微弱且呈弥散状分布, 而 p62 呈现较强的胞质荧光信号, 表明细胞处于低自噬基线水平。经 LC-EVLP 处理后, 细胞内的荧光模式发生显著重塑: LC3B 红色荧光强度随剂量增加逐渐增强, 并在核周及胞质区域形成典型的高亮点状聚集体, 提示胞质型 LC3-I 向自噬体膜型 LC3-II 的高效转化及自噬小体的募集。与此同时, p62 的绿色荧光强度呈剂量相关性显著减弱, 与 LC3B 的增强形成鲜明的负相关。索拉非尼组表现出与 LC-EVLP 高剂量组一致的“高 LC3B 聚集/低 p62 残留”表型。荧光强度定量分析

显示, 与对照组比较, LC-EVLP 中、高剂量组和索拉非尼组 LC3B 平均荧光强度显著升高 ($P<0.01$ 、 0.001), 而 p62 平均荧光强度显著降低 ($P<0.001$)。LC3B 点状聚集的增加伴随底物 p62 水平的下降, 提示 LC-EVLP 未对自噬末端降解过程产生明显阻滞作用, 而可能通过促进自噬小体的形成并维持溶酶体降解功能, 从而促进自噬流的正常进行。

为评估 LC-EVLP 作为抗肿瘤纳米制剂的系统安全性, 采集各组小鼠的主要脏器(心、肝、肺、肾)进行 HE 染色, 结果见图 17。与对照组比较, LC-EVLP 处理后小鼠各主要脏器均保持了正常的

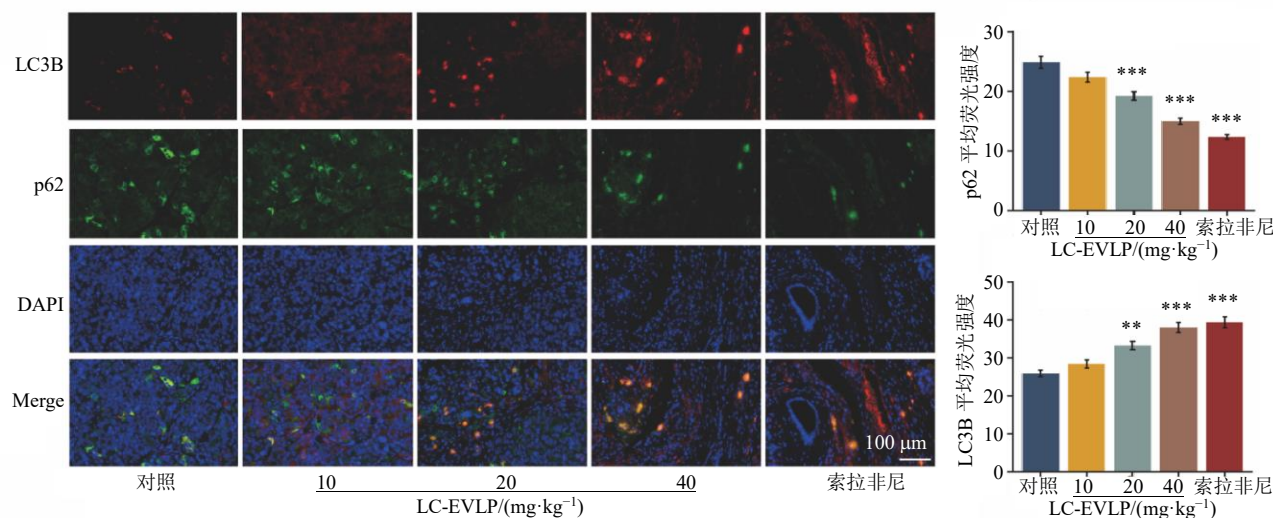


图 16 LC-EVLP 促进自噬水平升高 ($\times 200$; $\bar{x} \pm s$, $n = 5$)

Fig. 16 LC-EVLP increases autophagy levels ($\times 200$; $\bar{x} \pm s$, $n = 5$)

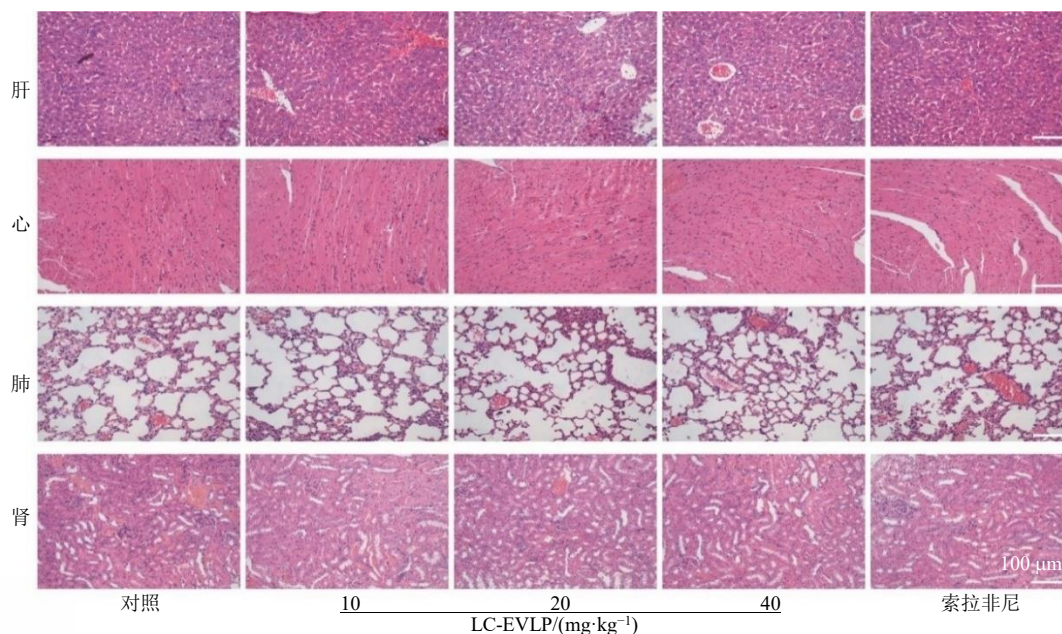


图 17 LC-EVLP 生物安全性 ($\times 100$)

Fig. 17 Biosafety evaluation of LC-EVLP ($\times 100$)

组织形态,未观察到明显的病理损伤或毒性反应特征。各组小鼠的心脏组织中心肌纤维排列整齐、致密,未见心肌断裂、萎缩或炎性浸润;肝脏组织显示出清晰的肝小叶结构,肝细胞以中央静脉为中心呈放射状排列,无明显肝细胞坏死、脂肪变性或淤血现象;肺脏组织中肺泡结构完整清晰,肺泡壁无异常增厚,且未见明显的出血或炎性细胞聚集;肾脏组织中的肾小球及肾小管结构形态正常,未发现肾小管扩张、上皮细胞脱落或间质水肿等肾毒性表现。表明 LC-EVLP 在体内具有良好的生物相容性与安全性。

4 讨论

HCC 的高复发率与获得性耐药性仍是当前临床治疗面临的重要问题,亟需探索具有不同作用机制的干预策略^[21-22]。近年来,PDNVs 因其良好的生物相容性及潜在的跨物种信息传递能力,逐渐受到关注^[23-24]。本研究分离并表征了源自半边莲的脂质双分子层纳米囊泡,为其作为天然纳米体系的研究提供了实验基础。基于表型与分子层面的分析结果,提示 LC-EVLP 可能通过影响 PDK1/PKM 相关代谢过程,并参与自噬相关调控。

LC-EVLP 的生物学活性与其理化特性密切相关。表征结果显示,其具有典型的外泌体样结构,并包含多类来源于半边莲的生物活性成分。在体外实验条件下,LC-EVLP 对 Mahlavu 细胞的抑制作用强于 LO2 细胞,表现为 2 种细胞在活力检测中的不同响应。该差异可能与肿瘤细胞与正常细胞在多方面生物学特性上的差异有关。一方面,肿瘤细胞通常具有更高的内吞活性及膜流动性,其细胞膜脂质组成和受体表达谱亦不同于正常细胞,可能促进纳米囊泡的摄取与胞内累积^[25-26];另一方面,肝癌细胞处于持续高增殖和高代谢负荷状态,对能量供给及代谢稳态具有更强依赖性,在 PDK1/PKM 介导的代谢轴受到干扰时,更易发生代谢应激,从而对 LC-EVLP 诱导的代谢重编程更为敏感。相比之下,正常肝细胞代谢状态相对稳定,对此类代谢干预的耐受能力可能更强。上述因素可能共同导致 LC-EVLP 在 2 类细胞中表现出差异性效应。

肿瘤细胞的增殖及其迁移、侵袭能力是肝细胞癌进展的重要生物学基础。本研究结果表明,LC-EVLP 可剂量相关性抑制 Mahlavu 细胞的克隆形成能力及 DNA 合成活性,同时降低其迁移与侵袭水平,提示其对肿瘤细胞增殖及运动相关表型具有抑

制作用。划痕愈合实验结果可能受细胞增殖状态干扰。本研究通过无血清培养以减少该影响,但尚未采用特异性增殖抑制剂进行进一步验证,因此 LC-EVLP 对迁移能力的影响仍需在更严格的实验条件下加以确认。相比之下,Transwell 侵袭实验在无血清上室条件下更侧重反映细胞的主动侵袭行为,从一定程度上支持其对侵袭能力的抑制作用。

明确细胞死亡的具体执行程序是评估抗肿瘤药物疗效的关键。尽管凋亡是化疗药物诱导死亡的主流观点,但本研究通过多维度的挽救实验证实,LC-EVLP 诱导的细胞死亡不依赖于凋亡或坏死性凋亡途径,而是主要归因于自噬性细胞死亡。TEM 观察到的双层膜自噬小体结构,结合 LC3-II/I 值升高及 p62 水平下降,提示细胞自噬相关过程发生变化。本研究中 LC3-I 与 LC3-II 水平均随 LC-EVLP 处理呈上升趋势,提示 LC3 蛋白整体表达水平可能受到调控。从生物学意义上看,LC3-I 为胞质可溶形式,其表达水平反映 LC3 蛋白的合成与储备状态;而 LC3-II 为与自噬膜结合的脂化形式,是自噬小体形成的重要标志,其水平升高通常与自噬结构的增加相关。在自噬激活过程中,LC3-I 持续向 LC3-II 转化,同时其表达亦可能在转录或翻译水平发生上调,因此在 LC3 总量增加的背景下,单一指标的变化可能存在一定局限性。在此基础上,LC3-II/I 值的升高结合自噬底物蛋白 p62 的持续下降,更倾向于反映自噬底物降解过程的增强,从而支持 LC-EVLP 促进自噬相关过程的激活。此外,本研究中自噬流阻断实验及溶酶体功能检测结果亦从动态层面提供了支持。自噬在肿瘤生物学中扮演着“双刃剑”的角色。在轻度应激下,自噬通常通过回收细胞器发挥促生存作用^[10,27];然而,本研究中自噬流阻断剂 BafA1 与 LC-EVLP 联用未能挽救细胞,反而加剧了死亡,且溶酶体酸化检测证实了自噬流的通畅性。这表明 LC-EVLP 诱发的是一种超越细胞耐受阈值的“过度自噬”。持续增强的自噬活性可导致细胞内关键物质的过度消耗,从而促进细胞死亡。

为进一步探讨致死性自噬的上游调控机制,本研究聚焦于肿瘤代谢重编程这一关键特征。HCC 细胞普遍表现出 Warburg 效应及对谷氨酰胺的高度依赖^[5,28-29]。本研究结果显示,LC-EVLP 可同时抑制糖酵解及谷氨酰胺代谢通路,从而对肿瘤细胞的能量供给产生双重影响。已有研究表明,肿瘤细胞具有一定的代谢可塑性,即在糖酵解受限时,常通过

上调谷氨酰胺分解以维持 TCA 的运转^[30-31]。在此背景下, LC-EVLP 对上述 2 条代谢途径的同步抑制, 可能在一定程度上削弱该代偿机制的作用。本研究通过引入特异性 PDK1 抑制剂 DCA 作为表型模拟工具, 对 PDK1 与 GLS1 之间的调控关系进行了探讨。结果显示, 单独抑制 PDK1 即可伴随 GLS1 蛋白水平的明显下降, 提示二者之间存在调控关联。基于此, 在该细胞模型中, PDK1 在谷氨酰胺代谢过程中发挥上游调节作用。因此, LC-EVLP 的作用不仅体现在对糖酵解途径的影响, 其通过调控 PDK1, 进一步影响 GLS1 介导的谷氨酰胺代谢过程, 从而在糖代谢受限的背景下, 对肿瘤细胞的替代性能量供给形成干扰。

此外, α -KG 挽救实验进一步支持了代谢改变与细胞死亡之间的关联。结果显示, 外源性补充 α -KG 能够恢复自噬流, 但对上游酶 (PDK1、PKM、GLS1) 的抑制状态未产生明显影响。该“酶水平未恢复”而“自噬表型改善”的现象提示: 一方面, LC-EVLP 在挽救条件下仍保持对相关靶点的作用; 另一方面, 自噬增强更可能与 TCA 循环中间体耗竭所引发的代谢应激相关, 而非单纯的非特异性毒性作用。基于上述结果, LC-EVLP 在该模型中对糖代谢与谷氨酰胺代谢均产生干预作用。通过影响 PDK1-GLS1 相关代谢轴, 其在糖代谢受限条件下可能削弱细胞通过谷氨酰胺途径进行能量补偿的能力, 并与自噬过程的增强相一致。

体外实验中观察到的相关分子变化在裸鼠移植瘤模型中得到了进一步验证。结果显示, LC-EVLP 在一定剂量范围内对肿瘤生长具有抑制作用, 并呈剂量相关性, LC-EVLP 高剂量组的抑瘤效果与索拉非尼相近。组织病理学分析显示, 肿瘤组织中 Ki67 增殖指数下降, 同时自噬相关标志物 (Beclin 1、LC3B) 表达上调, 该变化与体外实验中观察到的代谢与自噬调控趋势相一致。此外, 系统安全性评价中, 心、肝、肺、肾主要脏器未见明显病理异常。上述结果表明, LC-EVLP 在发挥抗肿瘤作用的同时, 整体表现出较好的生物安全性。

综上, 本研究进行了 LC-EVLP 的分离及基础表征, 并对其在肝癌中的作用机制进行了分析。结果提示, LC-EVLP 可能通过调节 PDK1/PKM 相关信号通路并影响谷氨酰胺代谢, 从而与肝癌细胞自噬过程的变化相关。相关研究结果为进一步探讨中草药来源活性成分在肿瘤代谢调控中的作用提供

了参考, 也为 PDNVs 在抗肿瘤领域的后续研究提供了实验依据。

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 A Cancer J Clin*, 2024, 74(3): 229-263.
- [2] Qi D, Qin Y Q, Zhu H D, *et al.* Resistance of first-line targeted drugs in hepatocellular carcinoma: The epigenetic regulation mechanisms [J]. *Cell Death Dis*, 2025, 16(1): 875.
- [3] Kudo M, Finn R S, Qin S K, *et al.* Lenvatinib versus sorafenib in first-line treatment of patients with unresectable hepatocellular carcinoma: A randomised phase 3 non-inferiority trial [J]. *Lancet*, 2018, 391(10126): 1163-1173.
- [4] Russo M, Chen M N, Mariella E, *et al.* Cancer drug-tolerant persister cells: From biological questions to clinical opportunities [J]. *Nat Rev Cancer*, 2024, 24(10): 694-717.
- [5] DeWaal D, Nogueira V, Terry A R, *et al.* Author Correction: Hexokinase-2 depletion inhibits glycolysis and induces oxidative phosphorylation in hepatocellular carcinoma and sensitizes to metformin [J]. *Nat Commun*, 2018, 9: 2539.
- [6] An L B, Li Z F. Molecular network of metabolic reprogramming and precision diagnosis and treatment of hepatocellular carcinoma [J]. *Biomark Res*, 2025, 13(1): 124.
- [7] Israelsen W J, Dayton T L, Davidson S M, *et al.* PKM2 isoform-specific deletion reveals a differential requirement for pyruvate kinase in tumor cells [J]. *Cell*, 2013, 155(2): 397-409.
- [8] Kroemer G. Autophagy: A druggable process that is deregulated in aging and human disease [J]. *J Clin Invest*, 2015, 125(1): 1-4.
- [9] Kroemer G, Mariño G, Levine B. Autophagy and the integrated stress response [J]. *Mol Cell*, 2010, 40(2): 280-293.
- [10] Liu S Z, Yao S J, Yang H, *et al.* Autophagy: Regulator of cell death [J]. *Cell Death Dis*, 2023, 14(10): 648.
- [11] 曹颖, 王豆, 李金玲, 等. 植物源纳米囊泡载药技术研究进展与应用前景分析 [J]. *中草药*, 2025, 56(19): 6913-6926.
- [12] Zheng Y Z, Wang T R, Zhang J X, *et al.* Plant-derived nanovesicles: A promising frontier in tissue repair and

- antiaging [J]. *J Agric Food Chem*, 2025, 73(22): 13159-13177.
- [13] Isik S, Alhelwani S, Sahsahi A, *et al.* Plant-derived exosome-like nanovesicles: Mechanisms and molecular understanding in neurological disorders with potential therapeutic applications [J]. *Drug Deliv Transl Res*, 2025, 15(12): 4452-4478.
- [14] Luo J, Chen Q X, Li P, *et al.* *Lobelia chinensis* Lour inhibits the progression of hepatocellular carcinoma via the regulation of the PTEN/Akt signaling pathway *in vivo* and *in vitro* [J]. *J Ethnopharmacol*, 2024, 318(PtA): 116886.
- [15] Elkhawas Y A, Gad H A, AbdelRazek M M M, *et al.* LC-ESI-MS/MS-based comparative metabolomic study, antioxidant and antidiabetic activities of three *Lobelia* species: Molecular modeling and ADMET study [J]. *ACS Omega*, 2024, 9(18): 20477-20487.
- [16] 罗浚嘉. 生姜外泌体抗结直肠癌作用及机制研究 [D]. 长沙: 中南大学, 2022.
- [17] Tapia-Aguayo A, Krüger S, Wessjohann L A, *et al.* Cocoa pulp as a novel source of plant-derived exosome-like nanovesicles: Method comparison and physicochemical characterization [J]. *Front Bioeng Biotechnol*, 2026, 13: 1729503.
- [18] Ingold I, Berndt C, Schmitt S, *et al.* Selenium utilization by GPX4 is required to prevent hydroperoxide-induced ferroptosis [J]. *Cell*, 2018, 172(3): 409-422.
- [19] Klionsky D J, Elazar Z, Seglen P O, *et al.* Does bafilomycin A1 block the fusion of autophagosomes with lysosomes? [J]. *Autophagy*, 2008, 4(7): 849-850.
- [20] 马玉明, 彭嘉文, 谢晶晶, 等. 半边莲的质量控制现状及质量标志物预测分析 [J]. *中华中医药学刊*, 2025, 43(2): 153-157.
- [21] Tümen D, Heumann P, Gülow K, *et al.* Pathogenesis and current treatment strategies of hepatocellular carcinoma [J]. *Biomedicines*, 2022, 10(12): 3202.
- [22] Llovet J M, Pinyol R, Kelley R K, *et al.* Molecular pathogenesis and systemic therapies for hepatocellular carcinoma [J]. *Nat Cancer*, 2022, 3(4): 386-401.
- [23] Dad H A, Gu T W, Zhu A Q, *et al.* Plant exosome-like nanovesicles: Emerging therapeutics and drug delivery nanoplatforms [J]. *Mol Ther*, 2021, 29(1): 13-31.
- [24] Mu N, Li J, Zeng L, *et al.* Plant-derived exosome-like nanovesicles: Current progress and prospects [J]. *Int J Nanomed*, 2023, 18: 4987-5009.
- [25] Thamizhchelvan A M, Ma H D, Wu T H, *et al.* Shape-dependent cellular uptake of iron oxide nanorods: Mechanisms of endocytosis and implications on cell labeling and cellular delivery [J]. *Nanoscale*, 2024, 16(46): 21398-21415.
- [26] Dasanayake G S, Hamadani C M, Singh G, *et al.* Imidazolium-based zwitterionic liquid-modified PEG-PLGA nanoparticles as a potential intravenous drug delivery carrier [J]. *Nanoscale*, 2024, 16(11): 5584-5600.
- [27] Jia H Q, Wei J, Zheng W, *et al.* The dual role of autophagy in cancer stem cells: Implications for tumor progression and therapy resistance [J]. *J Transl Med*, 2025, 23(1): 583.
- [28] DeBerardinis R J, Chandel N S. We need to talk about the Warburg effect [J]. *Nat Metab*, 2020, 2(2): 127-129.
- [29] Lee A C K, Lau P M, Kwan Y W, *et al.* Mitochondrial fuel dependence on glutamine drives chemo-resistance in the cancer stem cells of hepatocellular carcinoma [J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(7): 3315.
- [30] Altman B J, Stine Z E, Dang C V. From Krebs to clinic: Glutamine metabolism to cancer therapy [J]. *Nat Rev Cancer*, 2016, 16(10): 619-634.
- [31] Vander Heiden M G, Cantley L C, Thompson C B. Understanding the Warburg effect: The metabolic requirements of cell proliferation [J]. *Science*, 2009, 324(5930): 1029-1033.

[责任编辑 李亚楠]