

·综述·

植物来源细胞外囊泡在创面修复中作用的研究进展

王玮琪¹ 羊月婷¹ 苏志宏¹ 李瑾¹ 胡文慧² 张培华¹¹广东医科大学附属第一医院整形外科研究所, 湛江 524001; ²广东医科大学附属第一医院骨科, 湛江 524001

通信作者: 张培华, Email: zhangph1128@126.com

【摘要】 植物来源细胞外囊泡(EV)为植物细胞分泌的纳米级囊泡, 含有各种蛋白质、脂质及RNA分子, 能调节细胞之间的信息交流、物质传递, 是细胞通信的重要载体。当前, 动物来源EV在种间通信、细胞交流和药物载体研究中得到广泛应用; 而植物来源EV由于具有优越的生物相容性和靶向性及低免疫原性已受到人们的普遍重视, 与此同时植物来源EV研究和分析技术已取得较大进展。该综述围绕植物来源EV分离技术、表征鉴定及其在创面修复中的作用等方面进行阐述, 旨在为今后植物来源EV研究提供新思路和新途径, 并为其临床应用提供借鉴。

【关键词】 胞外囊泡; 植物; 组织工程; 离心法; 细胞增殖; 免疫调节; 创面修复

基金项目: 国家干细胞临床研究项目(MR-44-21-015762); 广东省省级科技计划项目(2016A020214018)

Research advances on the role of plant-derived extracellular vesicles in wound repair

Wang Weiqi¹, Yang Yueting¹, Su Zhihong¹, Li Jin¹, Hu Wenhui², Zhang Peihua¹¹Institute of Plastic Surgery, Affiliated Hospital of Guangdong Medical University, Zhanjiang 524001, China;²Department of Orthopaedics, Affiliated Hospital of Guangdong Medical University, Zhanjiang 524001, China

Corresponding author: Zhang Peihua, Email: zhangph1128@126.com

【Abstract】 Plant-derived extracellular vesicles (EVs) are nanoscale vesicles secreted by plant cells, containing various proteins, lipids, and RNA molecules, which can regulate the information exchange and material transfer between cells, thus are important carriers of cellular communication. Currently, animal-derived EVs have been widely used in interspecies communication,

cellular exchange, and drug carrier research; while plant-derived EVs have received widespread attention due to their superior biocompatibility and targeting and low immunogenicity. At the same time, research and analysis techniques of plant-derived EVs have made great progress. This review focuses on the isolation techniques, characterization and identification of plant-derived EVs and their role in wound repair, aiming to provide new ideas and avenues for future research on plant-derived EVs and to provide reference for their clinical applications.

【Key words】 Extracellular vesicles; Plants; Tissue engineering; Centrifugation; Cell proliferation; Immunomodulation; Wound repair

Fund program: National Stem Cell Clinical Research Project (MR-44-21-015762); Guangdong Provincial Science and Technology Plan Project (2016A020214018)

细胞外囊泡(extracellular vesicle, EV)是一种由细胞释放到外界环境中的脂质双层膜结构纳米级囊泡, 存在于多种生物, 包括哺乳动物、植物、真菌以及细菌等体内。EV一般为圆形或椭圆形, 其直径为30~100 nm, 为其提供在细胞之间以及细胞与外部环境之间自由迁移的条件, 同时也有助于防止其内部结构受到外部环境因素的影响^[1]。与动物来源EV相比, 植物来源EV生产效率较高、提取周期短、来源广泛、免疫原性较低^[2-3]。此外, 植物来源EV细胞毒性较小, 有优越的生物相容性^[4-6], 可通过内吞机制靶向特定组织治疗疾病^[7-8]。由于具有独特的结构特性和生物活性, EV在生物医学领域受到越来越多的关注。1967年, 研究人员第1次利用电子显微镜观察到胡萝卜细胞能够分泌小泡^[9]。2009年, 研究人员已经从葵花籽中提取出类似于EV的囊泡。有研究表明, 植物来源EV和动物来源EV在许多方面都有相似之处^[10]。本文就植物来源EV的特征、分离纯化技术和鉴定方法及植物来源EV在创面修复领域作用的相关

DOI: 10.3760/cma.j.cn501225-20240226-00072

本文引用格式: 王玮琪, 羊月婷, 苏志宏, 等. 植物来源细胞外囊泡在创面修复中作用的研究进展[J]. 中华烧伤与创面修复杂志, 2024, 40(12): 1199-1204. DOI: 10.3760/cma.j.cn501225-20240226-00072.

Wang WQ, Yang YT, Su ZH, et al. Research advances on the role of plant-derived extracellular vesicles in wound repair[J]. Chin J Burns Wounds, 2024, 40(12): 1199-1204. DOI: 10.3760/cma.j.cn501225-20240226-00072.



研究进行综述。

1 EV 的特征

EV 最初被视为细胞释放代谢产物的途径,但随着时间的推移,越来越多的证据显示 EV 在细胞信号传递和疾病的病理生理过程中起关键作用。目前的研究表明,几乎所有的细胞都有能力分泌 EV^[11-13]。

1.1 生成途径

目前的研究表明,EV 的生成途径主要有 2 种:经典生成途径和直接生成途径。其中前一种途径由细胞质外膜蛋白介导,后一种途径通过 EV 膜上的配体和靶细胞细胞膜上的受体结合,从而产生效应^[14-15]。目前多种类型的动物来源 EV 已经被识别,并已证实其在哺乳动物细胞间的通信中起关键作用;但由于植物细胞细胞壁的存在,关于植物来源 EV 的确切存在仍是一个有争议的话题。日益增多的研究证据表明,植物也会释放出具备多种功能的 EV,但关于植物来源 EV 的生成,目前的研究仍然不够深入。植物来源 EV 的生成可能存在 3 种途径:多泡体途径^[16]、液泡途径^[17]、外囊阳性细胞器途径^[18-19]。植物来源 EV 的多泡体途径与动物来源 EV 的经典途径有许多相似之处。多泡体途径被认为是植物来源 EV 的主要生物来源途径,其发生过程为多泡体与质膜结合后,次级囊泡被释放到细胞外的空间。在液泡途径中,由于液泡特殊的空间结构及生理生化特性,当植物遭受病原体侵害时,那些含有水解酶和防护成分的液泡会与质膜结合,并向细胞外释放出保护性物质,从而抑制病原体生长。外囊阳性细胞器途径是植物独有的非传统囊泡分泌方式,在该途径中,外囊阳性细胞器在胞内形成后,以单分子膜形式释放至细胞外。

1.2 结构特点

植物来源 EV 的双层脂质膜不仅有助于保护 EV 的内容物,还在 EV 与目标细胞的识别和融合过程中发挥作用。研究显示,磷脂酰胆碱、磷脂酰甘油、磷脂酰乙醇胺、磷脂酰肌醇以及磷脂酸是植物组织中常见的脂质类型^[20-22]。与动物来源 EV 中的蛋白质构成相比较,植物来源 EV 所包含的蛋白质种类相对较少且含量偏低。目前已经识别出的主要蛋白质种类包括调控糖脂代谢的胞质蛋白(如肌动蛋白和多种酶),以及与膜和囊泡有关的蛋白质和鸟苷三磷酸酶等^[23-24]。在植物来源 EV 中,存在多种 RNA 分子,包括微小 RNA 和其他非编码 RNA;除此之外,还可能含有其他小分子,例如代谢物;这些物质通过调节细胞通信或改变细胞膜通透性等机制调控宿主防御系统的发育。植物来源 EV 的构成和功能可能会因为植物的种类、成长阶段、组织种类以及环境因素(例如逆境应答)的不同而存在差异。

2 植物来源 EV 的分析

2.1 植物来源 EV 的分离技术

2.1.1 超速离心分离技术 目前超速离心分离技术是应用最广泛的 EV 分离方法,被称为 EV 提取与分离的“金标

准”。超速离心分离技术是基于原液中各种成分的密度和粒径大小的不同来获取所需的组分,该技术适用于处理沉降系数有显著差异的大剂量样本的分离工作。超速离心分离技术可以用于从溶液或液体体系中除去大分子物质,从而减少对组织器官结构的损伤并提高生物利用度。采用这种方法,无须对 EV 进行标记,从而避免了交叉污染的风险;另外,它具有操作简单、成本低的优点。然而,超速离心分离技术由于时间长、EV 的结构易被破坏且易聚集成块和脂蛋白共分离等多种因素,不利于后续的分析工作。如今,超速离心分离技术已经被广泛用于提取多种植物,包括生姜、柠檬、椰子、猕猴桃、哈密瓜、葡萄柚、橙子、番茄、蓝莓、豌豆和梨等来源的 EV^[25-27]。

2.1.2 密度梯度离心技术 密度梯度离心技术通常与超速离心分离技术结合使用,利用不同颗粒沉降系数差值形成多个条带,以纯化 EV。在植物来源 EV 的相关研究中,蔗糖被广泛用作密度梯度离心技术的介质。但高黏度的蔗糖溶液可能会减缓 EV 的沉降速度,从而导致 EV 需要较长沉淀时间^[28]。许多植物如天门冬^[29]、生姜^[20,30]、人参^[31]、柠檬^[32]的 EV 纯化过程都用到此技术。

2.1.3 聚合物沉淀技术 传统的高分子聚合物共沉淀技术是以聚乙二醇为媒介,经离心分离得到 EV。聚乙二醇是一种优良的水溶性大分子,其生物相容性好、可降解、化学性质稳定。聚合物沉淀技术具有操作简便、耗时短等优点,尤其适合大规模样品的测定。然而,目前聚合物沉淀技术所制备的 EV 纯度及循环利用效率均不高,易出现假阳性,且产生的高分子聚合物不易被完全除去,不利于后续功能检测。在此基础上,聚乙二醇适用于分离富集生姜中可食用纳米颗粒^[33]。研究人员使用 RNA 纯化提取试剂盒从大蒜来源 EV 中提取了 RNA^[34]。值得一提的是,该技术能从较小样本量中提取 EV,所以在从珍贵或难以获取的植物样本中提取 EV 时更具优势。

2.1.4 尺寸排阻色谱技术 尺寸排阻色谱技术是一种依据生物样本中的 EV 与其他成分的尺寸差异将 EV 分离出来的方法^[35]。尺寸排阻色谱技术的分离机制为大分子不能进入凝胶孔,它们和流动相一起沿着多孔凝胶之间的空隙被洗脱,而小分子则会被保留在凝胶的孔隙中,并最终被流动相洗脱。尺寸排阻色谱技术不需要使用任何化学试剂就可以实现 EV 的有效纯化。然而,尺寸排阻色谱的成本较高,需要特定的设备,对色谱柱的使用频率和加样体积都有一定的限制,而且该技术较复杂,涉及蛋白聚集体和脂蛋白与共分离的问题^[36-37]。尺寸排阻色谱技术的主要优点包括高效率、简便的操作方式和较短的时间消耗,能够提高 EV 生产效率,并确保 EV 完整性。

2.1.5 免疫亲和捕获技术 免疫亲和捕获技术作为一种应用普遍的生物隔离和检测手段,是建立在抗体与其特定抗原之间高度特异性结合基础上的。该技术通过在 EV 特定表面上修饰或设计特异识别基团来提高免疫亲和力,从而实现对不同样品进行分析。这项技术适用于目标分子

的富集、纯化以及检测。但通过免疫亲和和捕获技术获得的 EV 储存环境要求严格,因此该技术不适宜于分离大规模的 EV^[38-39]。研究者采用免疫亲和和捕获技术和蔗糖密度梯度离心技术分离拟南芥来源 EV,并在捕获的 EV 中检测到丰富的核小 RNA,包括 TAS1c-小干扰 RNA483、TAS2-小干扰 RNA453 和微小 RNA166^[40]。

2.1.6 微流控技术 微流控技术依赖于微米级通道和微流体,该技术的工作原理是基于微流体的属性和微米级通道的几何构造,使流体的控制和分析变得更为高效和精确;其主要目的是控制和操纵微小的液滴、粒子或细胞的流动。由于微流控技术独特的优点,其在生命科学领域得到广泛应用。微流控技术提取的 EV 具有高生产效率和高纯度,该技术主要优点包括小型化、集成化、高通量和时间短;但是该技术还未达到标准化,成本也相对高昂^[41-43]。

为高效获得高纯度的 EV,以满足未来临床应用及精准医疗的需求,综合分析上述分离纯化技术,微流控技术蕴含着巨大的潜能。因此本研究团队认为微流控技术有望在未来取代超速离心分离技术成为分离 EV 的“金标准”。

2.2 植物来源 EV 的表征鉴定

2.2.1 电子显微镜 透射电子显微镜、扫描电子显微镜和原子力显微镜通常被用于 EV 的形态学特征观测。其中,扫描电子显微镜主要用于观察 EV 的外部表面,透射电子显微镜则专注于 EV 内部的结构,提供有关 EV 粒度分布的信息。而原子力显微镜则用于测定 EV 的各种力学属性,例如硬度和弹性模量,这有助于研究者更好地理解 EV 的力学行为和稳定性。目前常用方法是先将外泌液采用有机溶剂处理后再采用透射电子显微镜观察,但由于透射电子显微镜的操作过程较为烦琐,对样本制备的要求较扫描电子显微镜更严格,因此不太适用于对大量样本进行迅速测量。有学者设计了一种新的方法——将扫描电子显微镜与原子力显微镜联合应用来检测体外培养的 EV,该方法具有较高的灵敏度、分辨率和可重复性,且易于实现自动化^[44]。

2.2.2 纳米粒子跟踪分析 纳米粒子跟踪分析能够用于测量 EV 的体积和浓度。通过对传统生物传感器进行改进,研究人员开发了一种基于光学成像原理的方法,用于快速、准确地监测内源性物质在体外的分泌情况。这项技术具有快速检测能力,能够实时且真实地观测到 EV,其分辨率甚至超过流式细胞仪,而且针对荧光颗粒的最低测量范围可以达到 30~40 nm。然而,纳米粒子跟踪分析仪的操作过程相当复杂,很难区分被污染的蛋白质与 EV,同时相机的技术水平和检测的阈值都会对测得的 EV 数量产生影响^[45]。

2.2.3 蛋白质印迹法 蛋白质印迹法通常被应用于检测 EV 标记蛋白的表达。作为一种经典的检测方法,这项技术已经非常成熟,能够对标记蛋白进行定性和定量分析,使利用蛋白质标志物来分析 EV 变得更为简单。由于蛋白质印迹法特异性高且分辨率高,所以被广泛用于细胞系或动物体内的外源物质的分泌情况以及疾病模型等方面的研

究。然而,蛋白质印迹法既复杂又耗时,并且亲本细胞种类会影响标记蛋白的检测,因此不太适用于检测生物流体中的 EV 标记蛋白^[46]。

2.2.4 流式分析术 流式分析术作为一种传统的 EV 表征检测手段,特别适用于 EV 生物标志物的识别。这种方法具有高通量和多通道分析的能力,不仅分析速度快,所需的样本浓度也相对较低。流式分析术通过将荧光探针标记到细胞表面或基质中可实现对 EV 形态和大小的定量观察,可以用于研究内源性物质在组织间转运及功能上的差异。但是光信号的检测精度和分辨率相对较低,多分散性和低折射率的特性限制了流式分析术的应用^[47]。

3 创面修复

创面修复是机体修复受损组织的复杂生物学过程,旨在恢复组织的结构和功能^[48-51]。这一过程涉及多种类型的细胞、细胞因子、生长因子和基质组分的协同作用,可以分为 4 个相互重叠的主要阶段:止血、炎症、增生和重塑阶段^[52-53]。

创面出现后即进入止血阶段,血小板聚集于创面处形成血栓,阻止进一步的血液流失;血小板的激活导致血管收缩和血液凝固,同时释放细胞因子吸引炎症细胞^[54]。炎症阶段一般持续数天,其间血液流向创面带来白细胞,以清除死亡的细胞、细菌和异物;巨噬细胞释放生长因子和细胞因子,促进新细胞生成并为下一阶段的血管新生做准备。增生阶段一般持续数周,其间 Fb 迁移到创面,产生胶原蛋白和其他 ECM 成分,形成新的组织;新的血管形成成为新组织的生长提供必要的营养和氧气;同时上皮细胞开始覆盖创面表面,通过再上皮化过程闭合创面^[55]。重塑阶段一般持续数月甚至数年,其间新生成的胶原纤维重新排列,提高组织的强度和稳定性;随着瘢痕形成,尽管新组织恢复了部分结构和功能,但可能不能完全恢复到原组织的水平。

4 植物来源 EV 的生物学作用及临床应用

4.1 促进细胞增殖

细胞增殖是创面修复的关键环节和新组织产生的基础。促进创面细胞增殖能加快新生组织形成,促进创面快速愈合,助力受损组织恢复结构与功能。

研究人员观察到人参来源 EV 能够提高人永生表皮细胞中的人 I 型胶原 α_1 链和人纤维连接蛋白 1 的基因转录水平,并增强 TGF- β_1 、波形蛋白和 Ki67 的蛋白质表达。这些研究证明人参来源 EV 能够调整皮肤细胞的生命周期,激活 TGF- β 通道,进而加速皮肤细胞的增殖和受损皮肤的恢复过程^[56]。有学者在研究芦荟来源 EV 时观察到其可以通过胞饮和膜融合等多种方式被人永生表皮细胞摄取。芦荟来源 EV 具有很好的阳离子自由基和活性氧清除能力,可有效促进细胞的增殖和迁移,相关动物模型实验的创面修复率更是高达 75.29%^[57]。葡萄柚来源 EV 可提升细胞活跃性和迁移能力,降低人永生表皮细胞中活性氧生成的剂

量依赖性,且增殖与迁移相关基因表达水平随其处理剂量增加而增强,呈剂量依赖关系^[58]。

4.2 免疫调节作用

在创面修复中,有效控制炎症反应强度和时,利于细胞增殖修复、减少瘢痕形成。巨噬细胞能破坏病原体、修复炎症损伤、感知组织炎症信号,防止炎症反应过度活化。

研究显示,茶叶来源EV含有大量的脂质、一些功能蛋白和许多具有生物活性的小分子,茶叶来源EV表面的半乳糖基团可借助半乳糖受体介导的内吞作用,使茶叶来源EV被巨噬细胞特异性内化。进一步研究观察到,茶叶来源EV能够减少活性氧的产生,抑制促炎性细胞因子的表达,促进巨噬细胞分泌IL-10。研究者通过在小鼠体内利用注射偶氮甲烷和葡聚糖硫酸钠模拟炎症性肠病及结肠相关癌症,证实茶叶来源EV具有抗炎作用^[59]。有研究表明,可食用植物来源EV可诱导小鼠巨噬细胞核转录因子红系2相关因子2核转位和肠道Wnt/TGF-4信号通路活化。核转录因子红系2相关因子2的核转位和Wnt/TGF-4信号通路活化在抗炎反应中起关键作用。其中生姜来源EV刺激巨噬细胞优先诱导IL-10和血红素氧合酶1,然后诱导核转录因子红系2相关因子2的核转位,因此核转录因子红系2相关因子2是血红素氧合酶基因的关键调节因子,在抗炎中有重要作用^[60]。另一研究观察到,小鼠口服生姜来源EV可以减轻葡聚糖硫酸钠诱导的急性肠炎;生姜来源EV通过促进肠道上皮细胞存活与增殖,降低肠炎小鼠中TNF- α 、IL-6、IL-1 β 等促炎性细胞因子的表达,增加活性氧负调节因子的表达,从而减轻炎症反应^[61]。

4.3 促进血管再生及再上皮化

血管再生和再上皮化这2个过程相互作用,共同促进创面愈合。机体的血管再生可以为再上皮化提供营养和氧气,有助于保护新生的血管和组织,防止液体丢失和感染。

研究显示,小麦来源EV在创面愈合过程中,促进了内皮细胞的管状结构形成,且提高了I型胶原的转录水平,说明小麦来源EV在创面愈合过程中具有较高活性^[62]。另一项研究观察到苦瓜来源EV联合莫匹罗星软膏对大鼠皮肤深II度烫伤创面有显著的促愈合作用,使用苦瓜来源EV联合莫匹罗星软膏的大鼠创面愈合速度快于单独使用莫匹罗星软膏或莫匹罗星软膏加湿润烧伤膏,且创面皱缩现象改善明显。在创面愈合后期,苦瓜来源EV能促进组织新生血管生长,使血小板-内皮细胞黏附分子表达水平高于单独使用莫匹罗星软膏或莫匹罗星软膏加湿润烧伤膏,说明苦瓜来源EV通过增强血管内皮合成加速烫伤创面愈合^[63]。

4.4 抗菌作用

抗细菌和真菌作用有助于预防感染,维护创面的清洁和健康环境,维持创面细胞的生存和增殖,促进愈合进程,通过对细菌和真菌的控制可以减轻免疫系统的负担,使其更好地应对其他可能的威胁。

研究表明生姜来源EV被口腔病原体牙龈卟啉单胞菌选择性摄取,生姜来源EV的脂质磷脂酸与牙龈卟啉单胞菌

表面的肝素结合蛋白相互作用,抑制细菌生长和产生致病性,生姜来源EV还可减少牙龈卟啉单胞菌在体内外的致病性,抑制牙龈卟啉单胞菌诱导的牙槽骨损失,调节免疫反应^[5]。另一项研究显示,经向日葵幼苗来源EV处理后的真菌孢子菌丝生长减少、形态异常,出现大量非萌发孢子,且多数菌丝失去活性;经向日葵幼苗来源EV处理3h后,部分真菌细胞细胞膜通透性改变,证明向日葵幼苗来源EV可使真菌细胞细胞膜透化并导致真菌细胞失活^[64]。

4.5 抗纤维化

抗纤维化对创面修复至关重要,能减少瘢痕形成,促使创面自然愈合,保持组织结构完整,减少对正常功能的不利影响,维持创面周围血管和神经的正常结构与功能,改善创面外观使其接近正常皮肤。研究者从红景天中提取出了含有红景天-小干扰RNA-m7的EV,该EV可有效降低肺纤维化小鼠 α 平滑肌肌动蛋白、纤维连接蛋白以及I型胶原 α_1 链的表达,显著减轻小鼠肺纤维化,证明红景天来源EV具有良好的抗纤维化效果^[65]。

5 总结与展望

植物来源EV是一种由植物细胞分泌的脂质双分子层囊泡,包含蛋白质、脂质及RNA分子等,已经被证明在许多生物学过程中起着重要作用。多项研究结果观察到,植物来源EV可以促进创面修复,并有调控炎症反应、活化细胞增殖与迁移、促进血管新生、抗纤维化、加速创面愈合进程等多重作用。在今后的研究中,需进一步优化植物来源EV提取、纯化及贮存方法,以保证植物来源EV的稳定性及生物活性;并需对植物来源EV生物安全性进行进一步研究,并对其长期应用可能产生的效果进行深入评价。在此基础上,探讨植物来源EV在临床上用于创面修复的可能性,从细胞水平深入探讨植物来源EV的特定作用机制,为实现精准医疗奠定理论基础,鼓励植物学、细胞生物学、材料科学及临床医学等多门学科之间的协作,以促进植物来源EV领域的研究。总之,目前采用植物来源EV促进创面修复的研究正在迅速发展并展示出广泛的应用前景。今后的研究可对其作用机制进行更深入探讨,并对其应用策略进行优化,从而可能会为创面愈合提供一种全新的治疗方案。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Kalluri R, LeBleu VS. The biology, function, and biomedical applications of exosomes[J]. *Science*, 2020, 367(6478): eaau6977. DOI:10.1126/science.aau6977.
- [2] Nelemans LC, Gurevich L. Drug delivery with polymeric nanocarriers-cellular uptake mechanisms[J]. *Materials (Basel)*, 2020, 13(2):366. DOI:10.3390/ma13020366.
- [3] Zhou M, Huang H, Wang D, et al. Light-triggered PEGylation/dePEGylation of the nanocarriers for enhanced tumor penetration[J]. *Nano Lett*, 2019, 19(6): 3671-3675. DOI: 10.1021/acs.nanolett.9b00737.
- [4] Kim MK, Choi YC, Cho SH, et al. The antioxidant effect of small extracellular vesicles derived from aloe vera peels for

- wound healing[J]. *Tissue Eng Regen Med*, 2021, 18(4): 561-571. DOI:10.1007/s13770-021-00367-8.
- [5] Sundaram K, Miller DP, Kumar A, et al. Plant-derived exosomal nanoparticles inhibit pathogenicity of *porphyromonas gingivalis*[J]. *iScience*, 2020, 23(2):100869. DOI: 10.1016/j.isci.2020.100869.
- [6] Song H, Canup BSB, Ngo VL, et al. Internalization of garlic-derived nanovesicles on liver cells is triggered by interaction with CD98[J]. *ACS Omega*, 2020, 5(36): 23118-23128. DOI:10.1021/acscomega.0c02893.
- [7] Gudbergsson JM, Jønsson K, Simonsen JB, et al. Systematic review of targeted extracellular vesicles for drug delivery - considerations on methodological and biological heterogeneity[J]. *J Control Release*, 2019, 306: 108-120. DOI: 10.1016/j.jconrel.2019.06.006.
- [8] Kalarikkal SP, Sundaram GM. Edible plant-derived exosomal microRNAs: exploiting a cross-kingdom regulatory mechanism for targeting SARS-CoV-2[J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2021, 414: 115425. DOI: 10.1016/j.taap.2021.115425.
- [9] Halperin W, Jensen WA. Ultrastructural changes during growth and embryogenesis in carrot cell cultures[J]. *J Ultrastruct Res*, 1967, 18(3): 428-443. DOI: 10.1016/s0022-5320(67)80128-x.
- [10] An Q, van Bel AJ, Hüchelhoven R. Do plant cells secrete exosomes derived from multivesicular bodies? [J]. *Plant Signal Behav*, 2007, 2(1):4-7. DOI:10.4161/psb.2.1.3596.
- [11] van Niel G, D'Angelo G, Raposo G. Shedding light on the cell biology of extracellular vesicles[J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2018, 19(4):213-228. DOI:10.1038/nrm.2017.125.
- [12] Crescitelli R, Lässer C, Lötval J. Isolation and characterization of extracellular vesicle subpopulations from tissues[J]. *Nat Protoc*, 2021, 16(3): 1548-1580. DOI: 10.1038/s41596-020-00466-1.
- [13] Debbi L, Guo S, Safina D, et al. Boosting extracellular vesicle secretion[J]. *Biotechnol Adv*, 2022, 59:107983. DOI:10.1016/j.biotechadv.2022.107983.
- [14] Jiang K, Dong C, Yin Z, et al. The critical role of exosomes in tumor biology[J]. *J Cell Biochem*, 2019, 120(5): 6820-6832. DOI:10.1002/jcb.27813.
- [15] Jadli AS, Ballasy N, Edalat P, et al. Inside(sight) of tiny communicator: exosome biogenesis, secretion, and uptake [J]. *Mol Cell Biochem*, 2020, 467(1/2): 77-94. DOI: 10.1007/s11010-020-03703-z.
- [16] Movahed N, Cabanillas DG, Wan J, et al. Turnip mosaic virus components are released into the extracellular space by vesicles in infected leaves[J]. *Plant Physiol*, 2019, 180(3): 1375-1388. DOI:10.1104/pp.19.00381.
- [17] Cui Y, Gao J, He Y, et al. Plant extracellular vesicles[J]. *Protoplasma*, 2020, 257(1):3-12. DOI:10.1007/s00709-019-01435-6.
- [18] 张雪萍, 鲁雨晴, 张月倩, 等. 植物细胞外囊泡及其分析技术的进展[J]. *生物技术通报*, 2023, 39(5):32-43. DOI:10.13560/j.cnki.biotech.bull.1985.2022-1106.
- [19] Cong M, Tan S, Li S, et al. Technology insight: plant-derived vesicles-how far from the clinical biotherapeutics and therapeutic drug carriers?[J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2022, 182: 114108. DOI:10.1016/j.addr.2021.114108.
- [20] 杨梦楠, 刘诗琦, 张静, 等. 果蔬中外泌体样纳米颗粒的分离、表征和应用研究进展[J]. *食品科学*, 2021, 42(9):355-361. DOI:10.7506/spkx1002-6630-20200418-240.
- [21] 姚楠. 植物脂质生物学进展[J]. *植物生理学报*, 2018, 54(12): 1747. DOI:10.13592/j.cnki.ppj.2018.1008.
- [22] 王炎钦, 董海涛. 磷脂酸在植物中的第二信使功能[J]. *中国生物化学与分子生物学报*, 2006, 22(9):697-703. DOI:10.3969/j.issn.1007-7626.2006.09.003.
- [23] Pérez-Bermúdez P, Blesa J, Soriano JM, et al. Extracellular vesicles in food: experimental evidence of their secretion in grape fruits[J]. *Eur J Pharm Sci*, 2017, 98: 40-50. DOI: 10.1016/j.ejps.2016.09.022.
- [24] Beach A, Zhang HG, Ratajczak MZ, et al. Exosomes: an overview of biogenesis, composition and role in ovarian cancer[J]. *J Ovarian Res*, 2014, 7: 14. DOI: 10.1186/1757-2215-7-14.
- [25] Takakura H, Nakao T, Narita T, et al. Citrus limon L.-derived nanovesicles show an inhibitory effect on cell growth in p53-inactivated colorectal cancer cells via the macropinocytosis pathway[J]. *Biomedicines*, 2022, 10(6): 1352. DOI:10.3390/biomedicines10061352.
- [26] Li DF, Tang Q, Yang MF, et al. Plant-derived exosomal nanoparticles: potential therapeutic for inflammatory bowel disease[J]. *Nanoscale Adv*, 2023, 5(14): 3575-3588. DOI:10.1039/d3na00093a.
- [27] Zhao Z, Yu S, Li M, et al. Isolation of exosome-like nanoparticles and analysis of microRNAs derived from coconut water based on small RNA high-throughput sequencing[J]. *J Agric Food Chem*, 2018, 66(11):2749-2757. DOI:10.1021/acs.jafc.7b05614.
- [28] 潘林思, 王文彩, 姚孟宇, 等. 植物源外泌体样纳米颗粒及其应用研究进展[J]. *中国中药杂志*, 2023, 48(22):5977-5984. DOI: 10.19540/j.cnki.cjcm.20230721.602.
- [29] Zhang L, He F, Gao L, et al. Engineering exosome-like nanovesicles derived from *Asparagus cochinchinensis* can inhibit the proliferation of hepatocellular carcinoma cells with better safety profile[J]. *Int J Nanomedicine*, 2021, 16: 1575-1586. DOI:10.2147/IJN.S293067.
- [30] Teng Y, Xu F, Zhang X, et al. Plant-derived exosomal microRNAs inhibit lung inflammation induced by exosomes SARS-CoV-2 Nsp12[J]. *Mol Ther*, 2021, 29(8): 2424-2440. DOI:10.1016/j.ymthe.2021.05.005.
- [31] Cao M, Yan H, Han X, et al. Ginseng-derived nanoparticles alter macrophage polarization to inhibit melanoma growth [J]. *J Immunother Cancer*, 2019, 7(1): 326. DOI: 10.1186/s40425-019-0817-4.
- [32] Zhang L, Li S, Cong M, et al. Lemon-derived extracellular vesicle-like nanoparticles block the progression of kidney stones by antagonizing endoplasmic reticulum stress in renal tubular cells[J]. *Nano Lett*, 2023, 23(4): 1555-1563. DOI:10.1021/acs.nanolett.2c05099.
- [33] Kalarikkal SP, Prasad D, Kasiappan R, et al. A cost-effective polyethylene glycol-based method for the isolation of functional edible nanoparticles from ginger rhizomes[J]. *Sci Rep*, 2020, 10(1):4456. DOI:10.1038/s41598-020-61358-8.
- [34] Liu J, Li W, Bian Y, et al. Garlic-derived exosomes regulate PFKFB3 expression to relieve liver dysfunction in high-fat diet-fed mice via macrophage-hepatocyte crosstalk[J]. *Phytomedicine*, 2023, 112: 154679. DOI: 10.1016/j.phymed.2023.154679.
- [35] Yang Y, Wang Y, Wei S, et al. Extracellular vesicles isolated by size-exclusion chromatography present suitability for RNomics analysis in plasma[J]. *J Transl Med*, 2021, 19(1): 104. DOI:10.1186/s12967-021-02775-9.

- [36] Guan S, Yu H, Yan G, et al. Characterization of urinary exosomes purified with size exclusion chromatography and ultracentrifugation[J]. *J Proteome Res*, 2020, 19(6): 2217-2225. DOI:10.1021/acs.jproteome.9b00693.
- [37] Otahal A, Kuten-Pella O, Kramer K, et al. Functional repertoire of EV-associated miRNA profiles after lipoprotein depletion via ultracentrifugation and size exclusion chromatography from autologous blood products [J]. *Sci Rep*, 2021, 11(1): 5823. DOI: 10.1038/s41598-021-84234-5.
- [38] Fitzgerald J, Leonard P, Darcy E, et al. Immunoaffinity chromatography: concepts and applications[J]. *Methods Mol Biol*, 2017, 1485:27-51. DOI:10.1007/978-1-4939-6412-3_3.
- [39] Li P, Kaslan M, Lee SH, et al. Progress in exosome isolation techniques[J]. *Theranostics*, 2017, 7(3): 789-804. DOI: 10.7150/thno.18133.
- [40] He B, Cai Q, Qiao L, et al. RNA-binding proteins contribute to small RNA loading in plant extracellular vesicles[J]. *Nat Plants*, 2021, 7(3): 342-352. DOI: 10.1038/s41477-021-00863-8.
- [41] 刘娜, 杜盼盼, 杨扬, 等. 基于微流控技术的外泌体分离方法的研究进展 [J]. *生物技术通报*, 2019, 35(1): 207-213. DOI: 10.13560/j.cnki.biotech.bull.1985.2018-0571.
- [42] Chen J, Li P, Zhang T, et al. Review on strategies and technologies for exosome isolation and purification[J]. *Front Bioeng Biotechnol*, 2022, 9: 811971. DOI: 10.3389/fbioe.2021.811971.
- [43] Liangsupree T, Multia E, Riekkola ML. Modern isolation and separation techniques for extracellular vesicles[J]. *J Chromatogr A*, 2021, 1636: 461773. DOI: 10.1016/j.chroma.2020.461773.
- [44] Pisitkun T, Shen RF, Knepper MA. Identification and proteomic profiling of exosomes in human urine[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2004, 101(36): 13368-13373. DOI: 10.1073/pnas.0403453101.
- [45] Maas SL, de Vrij J, van der Vlist EJ, et al. Possibilities and limitations of current technologies for quantification of biological extracellular vesicles and synthetic mimics[J]. *J Control Release*, 2015, 200: 87-96. DOI: 10.1016/j.jconrel.2014.12.041.
- [46] Théry C, Witwer KW, Aikawa E, et al. Minimal information for studies of extracellular vesicles 2018 (MISEV2018): a position statement of the International Society for Extracellular Vesicles and update of the MISEV2014 guidelines[J]. *J Extracell Vesicles*, 2018, 7(1): 1535750. DOI: 10.1080/20013078.2018.1535750.
- [47] Pospichalova V, Svoboda J, Dave Z, et al. Simplified protocol for flow cytometry analysis of fluorescently labeled exosomes and microvesicles using dedicated flow cytometer[J]. *J Extracell Vesicles*, 2015, 4: 25530. DOI: 10.3402/jev.v4.25530.
- [48] Wilkinson HN, Hardman MJ. Wound healing: cellular mechanisms and pathological outcomes[J]. *Open Biol*, 2020, 10(9):200223. DOI:10.1098/rsob.200223.
- [49] Peña OA, Martin P. Cellular and molecular mechanisms of skin wound healing[J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2024, 25(8): 599-616. DOI:10.1038/s41580-024-00715-1.
- [50] Pugliese E, Coentro JQ, Raghunath M, et al. Wound healing and scar wars[J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2018, 129: 1-3. DOI: 10.1016/j.addr.2018.05.010.
- [51] Jiang D, Guo R, Machens HG, et al. Diversity of fibroblasts and their roles in wound healing[J]. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2023, 15(3): a041222. DOI: 10.1101/cshperspect.a041222.
- [52] Childs DR, Murthy AS. Overview of wound healing and management[J]. *Surg Clin North Am*, 2017, 97(1): 189-207. DOI:10.1016/j.suc.2016.08.013.
- [53] Landén NX, Li D, Ståhle M. Transition from inflammation to proliferation: a critical step during wound healing[J]. *Cell Mol Life Sci*, 2016, 73(20):3861-3885. DOI:10.1007/s00018-016-2268-0.
- [54] Scully D, Sfyri P, Wilkinson HN, et al. Optimising platelet secretomes to deliver robust tissue-specific regeneration [J]. *J Tissue Eng Regen Med*, 2020, 14(1):82-98. DOI:10.1002/term.2965.
- [55] Rousselle P, Braye F, Dayan G. Re-epithelialization of adult skin wounds: cellular mechanisms and therapeutic strategies[J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2019, 146: 344-365. DOI: 10.1016/j.addr.2018.06.019.
- [56] 卢姝言, 杨松, 任李梅, 等. 人参外泌体促进 HaCat 细胞增殖和创面愈合 [J]. *中国生物化学与分子生物学报*, 2021, 37(11): 1510-1519. DOI:10.13865/j.cnki.cjbmb.2021.08.1297.
- [57] 曾鲁鹏, 王华英, 施婉华, 等. 基于芦荟皮层外泌体样囊泡的创面修复作用 [J]. *福建医科大学学报*, 2022, 56(6): 489-497. DOI:10.3969/j.issn.1672-4194.2022.06.005.
- [58] Savcı Y, Kırbas OK, Bozkurt BT, et al. Grapefruit-derived extracellular vesicles as a promising cell-free therapeutic tool for wound healing[J]. *Food Funct*, 2021, 12(11): 5144-5156. DOI:10.1039/d0fo02953j.
- [59] Zu M, Xie D, Canup BSB, et al. 'Green' nanotherapeutics from tea leaves for orally targeted prevention and alleviation of colon diseases[J]. *Biomaterials*, 2021, 279: 121178. DOI:10.1016/j.biomaterials.2021.121178.
- [60] Mu J, Zhuang X, Wang Q, et al. Interspecies communication between plant and mouse gut host cells through edible plant derived exosome-like nanoparticles[J]. *Mol Nutr Food Res*, 2014, 58(7):1561-1573. DOI:10.1002/mnfr.201300729.
- [61] Zhang M, Viennois E, Prasad M, et al. Edible ginger-derived nanoparticles: a novel therapeutic approach for the prevention and treatment of inflammatory bowel disease and colitis-associated cancer[J]. *Biomaterials*, 2016, 101: 321-340. DOI:10.1016/j.biomaterials.2016.06.018.
- [62] Şahin F, Koçak P, Güneş MY, et al. In vitro wound healing activity of wheat-derived nanovesicles[J]. *Appl Biochem Biotechnol*, 2019, 188(2): 381-394. DOI: 10.1007/s12010-018-2913-1.
- [63] 刘议聪, 高琪钊, 赵玉箫, 等. 苦瓜外泌体联合莫匹罗星软膏治疗大鼠皮肤深 II 度烫伤的研究 [J]. *徐州医科大学学报*, 2023, 43(8): 584-589. DOI: 10.3969/j.issn.2096-3882.2023.08.007.
- [64] Regente M, Pinedo M, San Clemente H, et al. Plant extracellular vesicles are incorporated by a fungal pathogen and inhibit its growth[J]. *J Exp Bot*, 2017, 68(20): 5485-5495. DOI:10.1093/jxb/erx355.
- [65] Du J, Liang Z, Xu J, et al. Plant-derived phosphocholine facilitates cellular uptake of anti-pulmonary fibrotic HJT-sRNA-m7[J]. *Sci China Life Sci*, 2019, 62(3): 309-320. DOI:10.1007/s11427-017-9026-7.

(收稿日期: 2024-02-26)