

植源性和乳源性胞外囊泡对慢性炎症的调控机制

曹桂芳¹, 李 丹¹, 伊高阳¹, 杨永利², 姚晓琳^{1*}

¹ 陕西科技大学食品与生物工程学院 西安 710021

² 西安交通大学生命科学与技术学院 西安 710049

摘要 胞外囊泡(EVs)是由动、植物细胞所分泌的一种囊泡复合体,富含不同种类脂质、蛋白质和 RNA 等活性组分,使其具有多种生理活性。炎症是机体在外界刺激下所表现出的一种免疫反应,当促炎因子和抗炎因子比例失衡时,机体会表现为慢性炎症。研究表明,植源性 EVs 中的外泌体样纳米囊泡(ELNs)和乳源性 EVs 因内含不同种类活性组分,故可通过抑制促炎细胞因子的分泌,上调抗炎因子及免疫细胞因子的表达,延缓机体慢性炎症反应及相关炎症性疾病的发生。基于此,本文归纳多种植源性 ELNs 和乳源性 EVs 的提取及表征方法,重点探讨植源性 ELNs 和乳源性 EVs 对机体炎症的调控作用,即从抑制核因子- κ B(NF- κ B)、氧化应激及相关丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)通路传导,调节肠道微生物组成及促进肠道干细胞生长,调控巨噬细胞相关通路的传导等方面进行综述,为植源性 ELNs 和乳源性 EVs 生物活性相关研究提供借鉴。

关键词 植源性外泌体样纳米囊泡; 乳源性胞外囊泡; 分离; 纯化; 抗炎机制; 发展趋势

文章编号 1009-7848(2024)07-0364-13 **DOI:** 10.16429/j.1009-7848.2024.07.036

胞外囊泡(Extracellular vesicles, EVs)是由真核细胞和原核细胞向胞外或胞质空间释放的一种粒径约为 100~1 000 nm 的囊泡复合体^[1-3]。外泌体作为 EVs 的重要组成部分,粒径约 30~150 nm,由磷脂双层膜包覆,内含蛋白质、脂质和 RNA 等多种活性组分,具有良好的胃肠屏障穿透性,在细胞间和种间通讯中发挥着重要作用^[4-7]。近年来,大量试验表明,植物细胞也可分离出一种类似于动物外泌体的胞外囊泡,称之为外泌体样纳米囊泡(Exosome-like nanovesicles, ELNs),其结构与动物外泌体类似,具有与源植物类似的生物活性^[8]。

炎症是由外界感染性、非感染性介质或自身产生的细胞损伤所引起,按发展过程及持续时间可分为急性炎症和慢性炎症。急性炎症是机体先天性抵御外来病原体入侵的固有免疫反应,然而,当体内促炎因子和抗炎因子比例失衡时,急性炎症即会转变为持续存在的慢性炎症,进而导致多种慢性炎症性疾病的形成^[9-11]。研究表明,植源性 ELNs 和乳源性 EVs 可通过多种方式干预机体慢

性炎症,如香菇 ELNs 可显著抑制核苷酸结合寡聚化结构域样受体蛋白 3(NLRP3)炎症小体的活性,有效减缓 D-半乳糖胺(GaIN)和脂多糖(LPS)诱导的小鼠肝脏炎症^[12]。牛乳来源 EVs 的粒径约 200 nm,可通过提高黏蛋白、杯状细胞表达标志物三叶因子 3(TFF3)和黏蛋白 2(MUC2)的相对水平,增强葡萄糖调节蛋白 94(GRP94)的表达,缓解 LPS 诱导的肠道炎症^[13]。另外,植源性 ELNs 和乳源性 EVs 具有来源广泛,提取成本低且产量高,生物相容性好等优势。本文归纳总结植源性 ELNs 和乳源性 EVs 调节炎症的作用机制,以期为 ELNs 和 EVs 干预机体炎症及相关疾病的研究提供理论基础。

1 植源性 ELNs 和乳源性 EVs 的分离

1.1 植源性 ELNs 和乳源性 EVs 的提取纯化

由于物理化学特性或生物学特性,如溶解度、密度、形状、尺寸、表面活性蛋白、亲和力、电荷正负差异等的区别, EVs 可通过超速离心法^[14]、蔗糖密度梯度离心法^[15]、尺寸排阻色谱法^[16-17]、超滤提取法^[18]、微流控芯片法^[19]、双水相提取法^[20]等进行分离提取。每种方法均有其各自的优势和局限性。尺寸排阻色谱法主要通过重力分离原理分离 EVs,其所得 EVs 纯度较高,且完整性和生物相容

收稿日期: 2023-07-04

基金项目: 国家自然科学基金项目(32272475, 32302276);
陕西省科技厅项目(2023-JC-QN-0198); 陕西省教育厅服务地方项目(22JC013)

第一作者: 曹桂芳,女,硕士生

通信作者: 姚晓琳 E-mail: yaoxiaolin1113@163.com

性较好,然而易与其它非胞外体污染物形成共沉淀,进而污染 EVs。超滤提取法获得的 EVs 纯度适中,然而过滤过程中剪切力会导致 EVs 附着于管壁内部,致使其形貌及生物活性受损。微流控芯片法虽然可得到高纯度 EVs,但是其仅适用于样本量较低的 EVs 的分离提取。双水相提取法可从脂肪酸、有机酸等生物污染物中分离 EVs,而 EVs 富集相的葡聚糖聚合物会影响 EVs 的组分及生物活性。与其它提取方法相比,超速离心法和蔗糖密度梯度离心法因简便、易操作,成为批量提取 ELNs 和 EVs 的“金标准”,其主要是根据悬浮液中不同物质相对密度和尺寸的差异,给予不同离心力,最高可达 100 000~150 000 $\times g$ 。如 Zhang 等^[21]和 Bruno 等^[22]通过超速离心法-蔗糖密度梯度离心法得到柑橘和芦笋 ELNs。常见的 11 种可食用植物蓝莓、椰子、生姜、葡萄柚、哈密瓜、猕猴桃、橙子、豌豆、梨、大豆和番茄等都可通过超速离心法进行分离提取^[23]。Samuel 等^[24]通过超速离心法从牛奶中分离得到牛奶 EVs。与乳源性 EVs 提取相比,植源性 ELNs 的提取需先将原材料经粉碎、碾磨、低速离心等操作,以去除杂质、较大颗粒及细胞碎片,获得粗品后再进一步经超高速离心得 ELNs。目前,关于 ELNs 和 EVs 的分离提取方法,仍处于初级阶段,其分离提取方法仍在不断优化。近年来,基于 ELNs 和 EVs 的结构特点,聚乙二醇(PEG)沉淀法,脂质体融合技术^[25]等分离提取方法相继出现。据报道,PEG 6000 在低 pH 条件(pH 5)下提取生姜 ELNs,其回收率与差速离心法相比,可提高 4~5 倍,且所得 ELNs 的尺寸较小,约 160 nm^[26]。另外,其活性组分和生物活性与差速离心法所得 ELNs 无较大差异,故有望作为一种新兴的分离提取技术用于植源性 ELNs 和乳源性 EVs 的分离。

1.2 植源性 ELNs 和乳源性 EVs 的表征

1.2.1 结构表征 植源性 ELNs 和乳源性 EVs 常用的结构表征方法是透射电子显微镜(TEM),其可用于观测样品的形态、尺寸、均匀性及表面亚显微结构。研究表明,植源性 ELNs 和乳源性 EVs 经 TEM 观测均呈典型囊泡结构,其中植源性 ELNs 多为茶托状、球状或杯状,乳源性 EVs 则多为球形或椭球形。例如,针叶樱桃 ELNs 在 TEM 下呈球状,分散性良好,粒径约 245 nm^[27]。牛乳 EVs 约为

100 nm,呈球状囊泡体^[28]。原子力显微镜(AFM)具有极高的分辨率,可对样品进行可视化分析。黄瓜 ELNs 通过 AFM 三维模式进行扫描,观测到其呈球状结构,粒径约 123 nm^[29]。扫描电子显微镜(SEM)虽然精度略低于 TEM,无法显示囊泡的层状结构,但也可用于观察 ELNs 的立体形态和整体结构。例如,SEM 观测茶花 ELNs 呈球状,粒径约为 131 nm,椰子汁 ELNs 呈椭球状,粒径分布在 100~200 nm 之间^[11-30]。此外,纳米颗粒跟踪分析(NTA)和动态光散射(DLS)可通过监测粒子的无规则运动和布朗运动,观测 ELNs 和 EVs 的尺寸和 Zeta 电位^[31]。Zeta 电位可反映溶液中的粒子在分散体系中受静电作用的影响情况,Zeta 电位的绝对值越大,体系越稳定^[32]。例如,葡萄 ELNs 粒径约 300 nm,表面电荷为(-26.3 \pm 58.14)mV,体系相对稳定^[33]。牛初乳(产犊后 24,48,72 h)和成熟乳 EVs 直径都在 30~150 nm 范围内,平均粒径分别为 123 nm 和 173 nm^[24]。与乳源性 EVs 相比,不同植物来源的 EVs 粒径差异较大,分布范围较广,多分布于 30~300 nm 之间,乳源性 EVs 的粒径多分布于 100 nm 左右,较为集中。

1.2.2 组分表征 不同来源 ELNs 和 EVs,其所含脂质、蛋白质和核酸组分组成不同,对其组分进行表征是进一步探究其抗炎活性的重要基础。

脂质,主要是利用薄层色谱法(TLC)分离脂质,通过三重四极杆质谱仪(Q-TRAP)进行脂质组分分析。脂质是构成 ELNs 和 EVs 磷脂双分子层膜的重要组分,主要包含磷脂和甘油^[34]。磷脂酸(PA)是 ELNs 中重要的脂质信号分子,可通过不同的作用模式调节细胞进程;双半乳糖二酰基甘油(DGDG)和单半乳糖二酰基甘油(MGDG)是 ELNs 中重要的糖脂,可在冻融过程中稳定 ELNs^[35]。如茶叶 ELNs 里面的主要脂质组分是磷脂酸,占总脂质(32.7%~45.7%)、磷脂酰甘油(19.3%~22.7%)、磷脂酰胆碱(13.6%~19.2%)和磷脂酰肌醇(5.9%~6.2%)。此外,茶叶 ELNs 含有部分磷脂酰丝氨酸,可与细胞表面的磷脂酰丝氨酸受体结合被巨噬细胞特异性识别,参与细胞免疫反应,是乳源性 EVs 所没有的特异性脂质^[36]。EVs 中的脂质主要包括鞘脂、胆固醇、神经酰胺、磷脂酰丝氨酸、磷脂酰乙醇胺和 PA,这些脂质可维持 EVs 的

结构稳定性^[37]。值得注意的是,ELNs和EVs中脂质的显著区别是ELNs中不含胆固醇^[38-39]。

蛋白质,可通过聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)法分离和确定蛋白的分子质量大小,进一步通过高效液相色谱-质谱联用仪(HPLC-MS)对其蛋白组学进行分析。EVs含有多种结构性蛋白和功能性蛋白,如质膜蛋白、胞浆蛋白、膜转运和融合蛋白、跨膜蛋白、信号蛋白等,其中最常见的是CD63、CD9和CD81,为EVs的标志性蛋白。EVs中所含蛋白种类相似,根据其来源不同,仍有区别,如Yang等^[39]通过对人、牛初乳和成熟乳EVs中蛋白组成分析得到,人、牛初乳和成熟乳EVs中含有920种蛋白,其中有575种表达存在差异。与EVs相比,ELNs中所含蛋白组分较少,据报道,葡萄ELNs中的膜蛋白主要包括质膜蛋白ATPase、ABC转运蛋白质家族等,网格蛋白和胞质蛋白等^[40-41]。葡萄ELNs中的蛋白主要包含调节糖

脂代谢的蛋白质(如苹果酸脱氢酶、磷酸甘油酸激酶和醛缩酶等),参与信号传导的蛋白质(如烯醇化酶1),与蛋白质折叠或蛋白质合成相关的信号肽^[42]等。目前,关于植源性ELNs蛋白组成分析尚处于初级阶段,ELNs的标志性蛋白尚不明确。

核酸,主要包括信使RNA(mRNA),长链非编码RNA和微RNA(miRNA)。植源性ELNs中RNA的种类少于EVs,主要为miRNA。miRNA可通过高通量小RNA测序,并利用实时聚合酶链式反应(QPCR)鉴定,使用靶基因预测软件进行分析。研究表明,牛奶EVs中可检测到多种与免疫相关的miRNA:如miR-155、miR-181a、miRNA-148a、miRNA-30b和miR-92簇等,其中miRNA-148a和miRNA-30b是乳源性EVs所特有的,可促进后代的生长、成熟、免疫和代谢,在维持机体健康方面发挥重要作用^[43]。

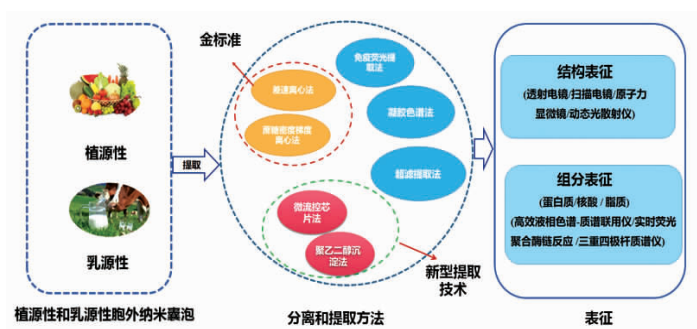


图1 植源性ELNs和乳源性EVs的提取、纯化及表征方法示意图

Fig.1 Extraction, purification and characterization of plant-derived ELNs and milk-derived EVs

2 植源性ELNs和乳源性EVs的抗炎活性

2.1 植源性ELNs的抗炎活性

植源性ELNs由磷脂双层膜包覆,内含不同种类脂质、蛋白质和RNA等活性组分,具有与源植物类似的生物活性。研究表明,植源性ELNs可通过降低活性氧的生成,减弱机体氧化应激损伤;阻碍促炎因子的分泌,加速伤口愈合;抑制高脂饮食或酒精诱导的多种神经性炎症;调节肠道菌群,维持肠道健康。草莓ELNs以剂量依赖性降低过氧化氢(H_2O_2)诱导的脂肪间充质干细胞(ADMSCs)内活性氧(ROS)的含量,缓解ADMSCs氧化造成的炎症损伤^[44]。小麦草汁ELNs预处理人真皮

成纤维细胞系(HDF)和人角质形成细胞系(HaCaT)细胞,可增强HDF和HaCaT细胞迁移的活性,加速伤口愈合^[45]。大蒜ELNs的磷脂酸(PA)(36:4)可优先被小胶质细胞摄取,通过与c-Myc转录因子竞争性结合CaM,抑制c-Myc的表达和活性,降低促炎因子干扰素- γ (IFN- γ)和肿瘤坏死因子- α (TNF- α)的表达水平,抑制高脂饮食诱导的HFD小鼠脑部炎症^[46]。燕麦ELNs可通过脑内皮细胞的自由扩散和主动运输穿过血脑屏障,与小胶质细胞中的海马钙素(HPCA)结合并吸收,下调促炎因子白细胞介素-6(IL-6)、白细胞介素-1(IL-1) β 、TNF- α 的表达,阻碍CD45mid、CD11b+

Ly6G 诱导的小胶质细胞产生,减缓酒精诱导的大脑炎症^[47]。苹果 ELNs 可被肠上皮 Caco-2 细胞内化,其中所含 miRNAs 可抑制肠道转运蛋白有机阴离子运输肽 OATP2B1 的表达,调节肠道菌群,维持肠道微生物稳态,影响肠道健康^[48]。

2.2 乳源性 EVs 的抗炎活性

乳源性 EVs 具有与植源性 ELNs 类似的结构特征,其所含活性组分可通过促进抗炎因子和免疫细胞因子的生成,下调炎症相关基因如 *TNF- α* 、*NF- κ B*、*TGF- β 1* 和 *Cox-2* 的表达,提高抗氧化酶活性,促进肠道益生菌生长,减缓氧化应激造成的机体损伤,缓解机体慢性炎症。牛乳 EVs 可增加鼠回肠上皮细胞血红素加氧酶(HO-1)蛋白的表达,清除细胞内 ROS,提高抗氧化酶的活性,减缓大鼠小肠隐窝上皮细胞(IEC-6)的氧化应激损伤^[49],改善 LPS 诱导的坏死性小肠结肠炎(NEC)。牛乳 EVs 干预 DSS 预处理的小鼠后,其结肠组织中促炎因子 *TNF- α* 和 *IL-6* 含量显著降低,双歧杆菌、杜伯氏菌属和乳梭菌属的相对丰度显著提高,且 KEGG 通路分析表明,*TNF* 受体相关因素 3 (*Traf3*) 基因表达显著降低,而抗炎基因 *Slc6a4*、*Serpina3k*、*Defb1* 和 *Trim27* 表达显著增加,可有效缓解小鼠结肠炎^[50]。牦牛乳 EVs 所含 bta-miRNA-34a 可提高 IEC-6 的存活率,缓解氧化应激损伤。此外,牦牛乳 EVs 可促进肠道干细胞增殖,上调抗炎因子 *IL-22* 的水平,显著提高 IEC-6 细胞的存活率,减缓炎症性肠道屏障损伤^[51]。人乳 EVs 可刺激小鼠肠道干细胞增殖,下调促炎因子 *IL-6* 和黏膜损伤相关 miRNA 靶基因的表达,缓解 DSS 诱导的肠道炎症^[52]。人乳 EVs 还可减缓机体氧化应激释放的活性氧(ROS)的相对含量,保护肠道干细胞(ISC)免受 H_2O_2 诱导的坏死性小肠结肠炎(NEC)^[53]。骆驼乳 EVs 可显著下调小鼠脾细胞中 *IFN- γ* 、*IL-6* 和 *TNF- α* 的表达,显著增加胞内白蛋白、球蛋白、过氧化氢酶(CAT)的数量,减缓磷酸酞胺(CTX)诱导的氧化应激,提高机体抵抗肠道炎症的能力^[54]。

综上,植源性 ELNs 和乳源性 EVs 可通过多种方式缓解机体慢性炎症,由于所含活性组分不同,其调控慢性炎症的机制也不同。因此,对不同来源 ELNs 和 EVs 调控慢性炎症的机制进一步归

纳总结,可为 ELNs 和 EVs 的炎症调控及相关生物活性研究提供理论基础。

3 植源性 ELNs 和乳源性 EVs 调节慢性炎症作用机制

大量研究表明,植源性 ELNs 如胡萝卜、生姜、葡萄、西兰花、葡萄柚及乳源性 EVs 包括牛乳、人乳、骆驼乳等均可缓解机体慢性炎症,其主要调节机制为:通过阻碍 *TNF*、*TLR* 及 *NLRP3* 炎症小体的表达,抑制核因子- κ B(Nuclear factor kappa-B, *NF- κ B*)通路传导;抑制氧化应激及相关丝裂原激活蛋白激酶(Mitogen-activated protein kinase, *MAPK*)通路传导,下调促炎因子的表达;阻碍 *IL-6* 介导的 Janus 激酶-转录激活因子(*JAK-STAT*)通路,抑制促炎基因转录,调控机体炎症反应。此外,植源性 ELNs 和乳源性 EVs 还通过调节肠道菌群及维持肠道微环境动态平衡,上调抗炎因子及细胞增殖因子的表达,减缓机体炎症^[55-56];增强巨噬细胞及小胶质细胞等细胞的免疫功能,分泌免疫细胞因子及抗炎因子,提高机体抗炎能力(图2)。

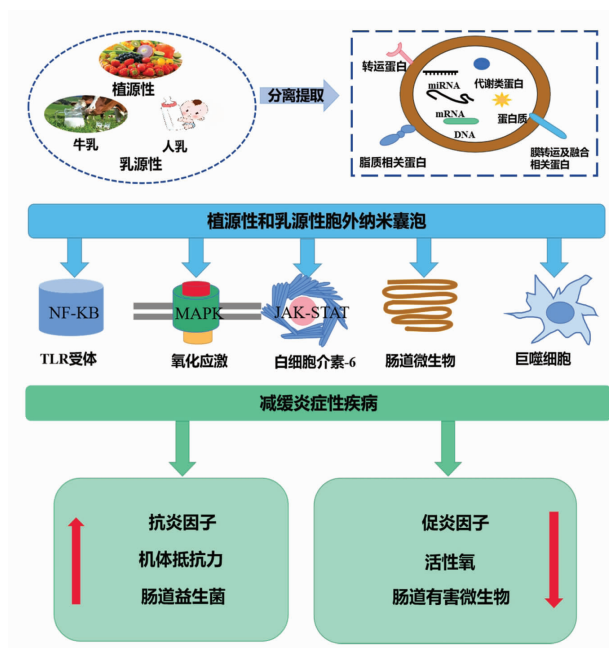


图2 植源性 ELNs 和乳源性 EVs 调控炎症的主要途径
Fig.2 Inflammatory pathways regulated by plant-derived ELNs and milk-derived EVs

3.1 抑制 NF- κ B 通路

植源性 ELNs 和乳源性 EVs 可通过下调肿瘤坏死因子(TNF)和 Toll 受体(TLR)的表达及抑制 NLRP3 炎症小体的形成,抑制 NF- κ B 通路的传导,缓解机体炎症(图 3)。TNF 是一类促炎细胞因子,含有两种受体 TNF-R1 和 TNF-R2^[57]。有研究表明,坚果(加州核桃、榛子和美洲核桃)ELNs 中的 miR159a 和 miR156c 可显著抑制炎症标志物 TNF- α 和脂肪合成相关蛋白(Tnfrsf1a 蛋白)的表达,缓解肥胖和糖尿病小鼠模型诱导的慢性炎症^[58]。生姜 ELNs 中的 miRNA aly-miR396a-5p^[59-60]和姜黄 ELNs^[61]可通过下调促炎细胞因子 TNF- α 、IL-6 和白细胞介素-1 β (IL-1 β) 的表达,抑制 TNF-R1 和 TNF-R2 介导的 NF- κ B 通路的传导,缓解 LPS 诱导的小鼠结肠炎。牛乳 EVs 可通过抑制 TNF- α 的表达,降低 LPS 诱导的野生型大鼠胞内 NF- κ B 表达水平,显著增加抗炎细胞因子的表达,缓解肠道炎症^[62]。TLR 是炎症反应的另一类重要信号转导膜蛋白,有研究表明,生姜 ELNs 中的姜烯酚以 TLR4 依赖性方式介导核因子红细胞 2 相关因子 2(Nrf2)的表达,阻碍下游 NF- κ B 通路的传导,缓解酒精诱导的肝脏炎症损伤^[63]。人乳 EVs 可同时下调 TNF- α 和 TLR4 的表达,阻碍 NF- κ B 通路的传导,减缓 LPS 诱导的坏死性小肠结肠炎(NEC)^[64]。此外,与成熟乳 EVs 相比,人初乳 EVs 可显著减少炎症标志物 TNF- α 和 TLR4 基因的表达,可能与初乳所含免疫物质,如免疫球蛋白、白细胞介素、转化生长因子等含量高于成熟乳有关。另外,TLR 还参与其它炎症信号通路的传导。苦瓜 ELNs 可通过阻碍 TLR 的表达,抑制磷酸肌醇 3 激酶-蛋白激酶(PI3K-AKT)通路,阻碍下游 NF- κ B 通路的传导,促进炎症细胞凋亡,提高抗炎因子的表达,缓解大脑神经炎症^[65]。TLR 还可经外界因素激活后促进 NF- κ B 通路上游受体 MyD88 的分泌,促进炎症反应的生成。如人参 ELNs 可降低 TLR4 及受体 MyD88 的分泌,阻碍 LPS 诱导的 NF- κ B 途径的磷酸化,进一步阻止 NF- κ B 通路的传导,减轻巨噬细胞造成的炎症损伤,抑制黑色素瘤的生长^[66]。炎症小体 NLRP3 是一种细胞内蛋白复合物,可通过激活半胱天冬氨酸酶,将促炎相关蛋白释放到机制循环中,促进炎

症反应的生成^[67]。研究表明,抑制炎症小体 NLRP3 的活性,可有效缓解机体炎症及相关疾病的发生^[68]。生姜 ELNs 可显著抑制巨噬细胞中 NLRP3 炎症小体的形成,阻碍下游炎症相关因子如 IL-1 β 和 IL-18 的分泌,阻碍 *Nlrp*、*IL-1 β* 和 *TNF- α* 基因的 mRNA 水平表达,减缓 LPS 诱导的机体炎症^[69]。蜂蜜 ELNs 所含 miR-4057 可通过阻止凋亡相关斑点样蛋白(ASC)寡聚化,阻碍 NLRP3 炎症小体的形成,抑制 NLRP3 炎症小体 Casp1 自裂解产物 Casp1p10 的形成和 pro-IL-1 β 和 IL-18 的表达,其中 pro-IL-1 β 的蛋白表达水平以剂量依赖性方式降低,显著减缓 D-半乳糖胺 (GalN)和 LPS 诱导的急性肝损伤的炎症反应和肝损伤^[70]。韭菜 EVs 中的磷脂 1,2-二酰油酰-sn-甘油-3-磷酸胆碱 (1,2-Dilinoleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine,DLPC) 在小鼠急性肝损伤模型及高脂饮食诱导的肥胖鼠模型中均表现出有效的抗 NLRP3 炎症小体活性,可抑制促炎因子 IL-6 和 TNF- α 的释放,阻碍下游 NF- κ B 通路的传导,减缓肥胖、急性肝炎和糖尿病等复杂炎症性疾病的发生^[71]。因此,不同来源的 ELNs 抑制 NLRP3 炎症小体形成的主要活性组分不同,其主要活性组分及具体机制仍有待进一步研究。NF- κ B 通路是炎症反应中最主要的一条炎症通路。植源性 ELNs 和乳源性 EVs 可通过干扰机体免疫细胞的特异性识别受体,如 TLR 受体、TNF 受体、NLRP3 炎症小体等,

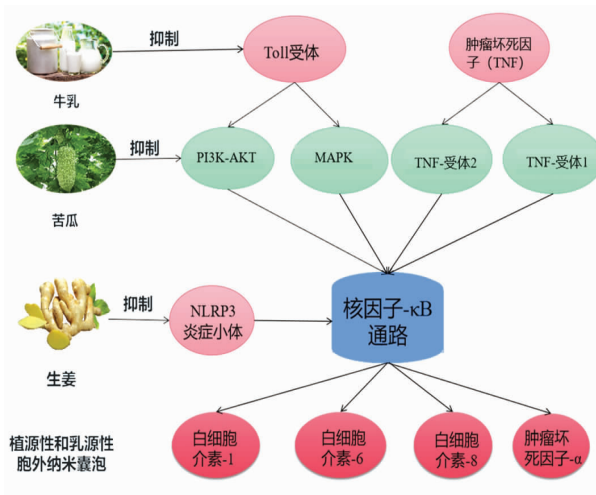


图3 植源性 ELNs 和乳源性 EVs 调控 NF- κ B 炎症通路

Fig.3 Plant-derived ELNs and milk-derived EVs regulate NF- κ B pathways

抑制 NF- κ B 通路介导的宿主炎症,阻碍炎症标志物 TNF- α 及促炎因子(IL-12、IL-18、IL-17 等)的分泌,抑制炎症反应的进行,减缓机体慢性炎症及相关疾病的发生。

3.2 抑制氧化应激及相关 MAPK 通路

细胞受到氧化应激刺激后,可激活 MAPK 通路的传导,刺激免疫细胞分泌大量炎症因子。植源性 ELNs 和乳源性 EVs 可减缓氧化应激造成的炎症损伤,同时阻碍氧化应激诱导的 MAPK 通路传导,促进抗炎因子的表达,降低促炎因子的含量,缓解机体炎症(图 4)。有研究表明,牛乳 EVs 可显著降低 H_2O_2 诱导的胞内 ROS 水平,抑制促炎因子 IL-6、TNF- α 和促炎趋化因子环氧化物酶(COX-2)的表达,促进免疫细胞增殖分化,增加胞内抗氧化酶 SOD 的含量,减弱鼠回肠上皮细胞 IEC-18 和 IEC-6 的炎症损伤^[72-73]。蓝莓 ELNs 可上调 HepG2 细胞中 B 淋巴细胞瘤-2 基因(*Bcl-2*)和血红素加氧酶 HO-1 的表达,降低 ROS 水平,加速 Nrf2 的核易位,减缓氧化应激造成的非酒精性脂肪性肝炎损伤^[74]。Robertis 等^[75]的研究表明,人内皮细胞系 EA.hy926 细胞以剂量依赖性方式内化蓝莓 ELNs,并通过抑制 TNF- α 诱导的 ROS 生成及 29 个炎症相关基因表达(>1.5 倍),减弱炎症引起的心脑血管疾病。此外,当机体受到多种细胞外(氧化应激和内质网应激)和细胞内(肽生长因子、细胞因子、激素)刺激,会导致巨噬细胞或小胶质细胞产生过量 ROS,激活 MAPK 通路,从而引起组织和器官炎症^[76]。MAPK 信号通路包含 3 个组分,分别为 MAP3Ks、MAP2Ks 和 MAPKs。MAP3Ks 磷酸化并激活 MAP2Ks,进而磷酸化并激活 MAPKs,MAPK 通路形成,释放炎症因子^[77-81]。MAPK 通路可分为 p38MAPK、ERK-MAPK、SAPK-JNK 三大通路。有研究表明,人乳 EVs 可通过减缓 H_2O_2 诱导的氧化应激损伤,减少胞内 ROS 的生成,阻碍 p38MAPK 通路的传导,降低促炎因子 IFN- γ 、IL-5 和 IL-9 的表达,增强机体抗炎和免疫能力。进一步对其脂质进行富集分析,得到其所含的 50 种脂质与 MAPK 途径密切相关,且可通过阻碍与 ERK-MAPK 途径相关的蛋白表达,降低促炎因子含量,有效改善 NEC^[52,82]。植源性 ELNs 和乳源性 EVs 可改善机体氧化应激造成的炎症损

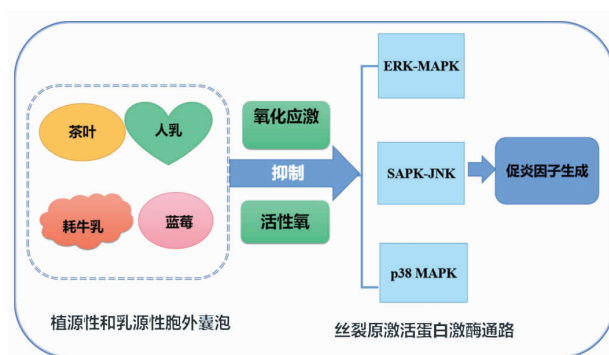


图 4 植源性 ELNs 和乳源性 EVs 调控氧化应激及相关 MAPK 炎症通路

Fig.4 Plant-derived ELNs and milk-derived EVs regulate oxidative stress and MAPK pathways

伤,抑制 MAPK 通路的传导,其中植源性和乳源性 EVs 抑制 SAPK-JNK 通路的研究较少,在未来可能会成为一个研究方向。

3.3 调节肠道微生物组成及肠道干细胞生长

肠道微生物的生理状态与机体免疫息息相关,维持肠道菌群平衡及肠道微环境健康,对提高肠道环境抗炎能力及改善肠道相关炎症具有重要意义。有研究表明,植源性 ELNs 和乳源性 EVs 可通过口服途径到达人体胃肠道,靶向促进鼠李糖乳杆菌(LGG)、嗜热链球菌和双歧杆菌等肠道益生菌及肠道干细胞的增殖和生长,维持肠道微生物稳态,缓解肠道屏障损伤及肠道炎症(图 5)。LGG 的增加与肠道免疫稳态的动态平衡成正相关^[55,83-85],有研究表明,生姜 ELNs 可作用于肠道微生物,并作为配体激活宿主抗炎途径,其所携带的特异性 miRNA mdo-miR7267-3p 可靶向 LGG, ath-miR-167a 可下调 *SpaC* 基因的表达,维持肠道微生物稳态,提高肠道免疫水平和抗炎能力,改善小鼠结肠炎。生姜 ELNs 中 miR-166p、miR-166u、miR-166a 可显著抑制牙周病原体牙龈卟啉单胞菌的增殖,缓解牙周炎^[86]。柠檬 ELNs 可通过上调肠道乳酸杆菌中基于 tRNA 基因的表达,增强 LGG 和嗜热链球菌 ST-21(STH)介导的胆汁抗性,提高益生菌的肠道存活率,降低艰难梭菌(CDI)感染的致死率,减缓肠道炎症^[84]。柑橘 ELNs 可通过增强 LGG 的表达,显著减缓肠道屏障损伤,促进抗炎因子和细胞生长因子的释放,缓解肠道炎症^[22]。荞麦 ELNs 与肠道微生物共发酵试验表

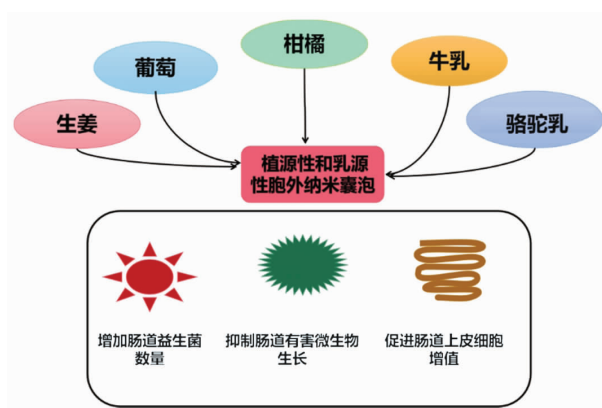


图5 植源性 ELNs 和乳源性 EVs 调节肠道微生物及肠道干细胞的生长

Fig.5 Plant-derived ELNs and milk-derived EVs regulate the growth of intestinal microorganisms and intestinal stem cells

明,荞麦 ELNs 可显著增加肠道益生菌含量,并呈浓度依赖性促进大肠杆菌和 LGG 的生长及短链脂肪酸(SCFAs)的产生,SCFAs 含量与肠道微生物稳态及机体健康成正相关^[87]。茶叶 ELNs 预处理 DSS 诱导的结肠炎小鼠后,可显著增加肠道微生物菌群的丰富度及物种多样性。其代谢组学分析表明,分泌 SCFAs 的钩端螺旋菌科相关菌群数量显著增加,双歧杆菌和具有抗炎作用的丁酸含量也显著增加^[36]。此外,有研究表明,牛乳 EVs 也可通过与肠道微生物相互作用,改变肠道微生物的组成,增加 SCFAs 的相对含量,上调抗炎相关基因的表达,提高肠道免疫能力及抗炎能力^[50]。葡萄 ELNs 中的脂质以剂量依赖性方式促进鼠肠道 Lgr5+干细胞增值分化,有效缓解肠道屏障损伤及 DSS 诱导的肠炎^[42]。植源性 ELNs 和乳源性 EVs 可通过抑制肠道有害菌的生长,提高益生菌的相对含量,维持肠道微环境相对稳态,缓解多种炎症性肠道疾病。

3.4 调控巨噬细胞相关通路

巨噬细胞可通过调节机体免疫应答,阻碍炎症反应的传导,缓解机体炎症。植源性 ELNs 和乳源性 EVs 可通过靶向不同类型的巨噬细胞,抑制促炎因子并激活抗炎因子的表达,减缓机体炎症(图6)。巨噬细胞分为促炎性 M1 巨噬细胞和抗炎性 M2 巨噬细胞。M1 巨噬细胞可通过 IFN- γ 及 LPS 活化,分泌促炎因子 TNF- α 和 IL-6 等,促进

炎症反应。M2 巨噬细胞则可通过促进抗炎细胞因子 IL-4、IL-13、IL-10 和 TGF- β 等的分泌,减缓机体炎症^[88-90]。研究表明,葡萄柚 ELNs 可靶向肠巨噬细胞,上调血红素加氧酶 1(HO-1)的表达,抑制促炎细胞因子 IL-1 β 和 TNF- α 的分泌,减缓肠道炎症反应^[91]。进一步研究表明,葡萄柚 ELNs miR-18a 可通过巨胞饮作用和网格蛋白依赖性途径被肝巨噬细胞内化,抑制 M1(F4/80+干扰素 γ +IL-12+)巨噬细胞诱导的促炎因子 TNF- α 和 IL-6 的表达,减缓 IFN- γ 及 LPS 诱导的肝脏炎症^[92]。人参 ELNs 可靶向小鼠黑色素瘤细胞中巨噬细胞的特异性受体,显著上调 M1 巨噬细胞中促炎因子 IL-4、IL-13、IL- α 和 IL-12 的表达,下调 M2 巨噬细胞抗炎细胞因子 TGF- β 和 IL-10 的表达,促进小鼠黑色素瘤细胞产生炎症及细胞凋亡,通过负反馈调节炎症机制,提高宿主的抗炎及免疫能力^[60]。茶叶 ELNs 可通过半乳糖受体介导的内吞作用,介导巨噬细胞特异性内化,上调 HO-1 的表达水平。酶联免疫吸附试验(ELISA)结果分析表明,茶叶 ELNs 处理小鼠单核巨噬细胞 RAW264.7 后,促炎因子 IL-12 表达水平显著降低,抗炎因子 IL-22 和 IL-10 分泌增加,可有效抑制肠道炎症^[36]。此外,另有研究表明,生姜 ELNs 可被肠巨噬细胞靶向性摄取,减少肠巨噬细胞介导的促炎细胞因子

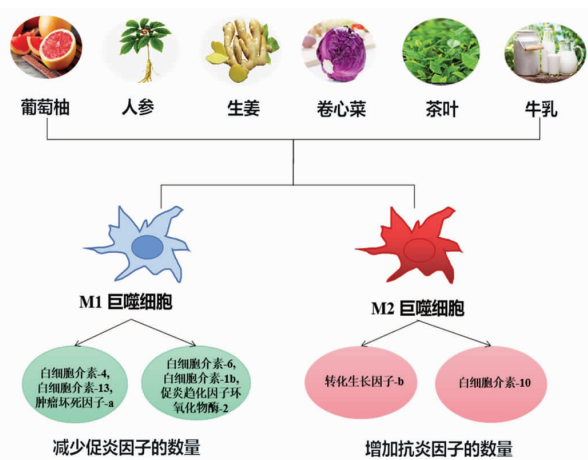


图6 植源性 ELNs 和乳源性 EVs 通过巨噬细胞生长调节炎症

Fig.6 Plant-derived ELNs and milk-derived EVs regulate inflammation by controlling the signal pathways related with macrophages

TNF- α 和 IL-1 β 的分泌,上调抗炎因子 IL-22 和 IL-10 的表达^[93]。胡萝卜 ELNs 可诱导巨噬细胞中 IL-10 的表达,促进巨噬细胞中 Nrf2 的表达,减缓机体慢性炎症^[83]。卷心菜 ELNs 和紫甘蓝 ELNs 可降低 LPS 处理的 RAW 264.7 巨噬细胞中 IL-6、IL-1b 和 COX-2 的表达水平,显示出明显的抗炎作用^[94]。牛乳和羊乳 EVs 也可被肠巨噬细胞靶向摄取,降低 TNF- α 和 IL-6 的水平,缓解肠道炎症^[95-96]。植源性 ELNs 和乳源性 EVs 可通过调控巨噬细胞,抑制 M1 巨噬细胞分泌促炎因子,促进 M2 巨噬细胞分泌免疫细胞因子,阻碍慢性炎症,缓解慢性炎症造成的机体损伤,干预机体健康。

4 结论和展望

大量研究表明,植源性 ELNs 和乳源性 EVs 可通过抑制促炎因子和氧化应激相关过量 ROS 的生成,抑制 NF- κ B 和 MAPK 通路的传导,同时可通过干预肠道微生物组成及提高巨噬细胞免疫功能等,上调抗炎因子和免疫因子的表达水平,缓解机体炎症。随着人们对 ELNs 和 EVs 结构和活性组分研究的不断深入,其主要活性组分及调控炎症的机理将越来越完善。ELNs 和 EVs 具有来源广泛,可被细胞高效内化,低毒性及内在靶向性等一系列优势,可携带其特定活性组分到达受体细胞,发挥生物活性。然而,目前关于 ELNs 和 EVs 的研究尚处于初级阶段,其分离提取方法尚存在一定局限性,无法实现规模化生产;其鉴定方法还仅局限于透射电镜观察和粒径分析;其特定活性组分功能研究作用机制仍有待进一步挖掘。尽管如此,植源性 ELNs 和乳源性 EVs 作为一种天然的具有良好生物相容性和可穿越胃肠屏障的脂质纳米囊泡,关于其生物活性及相关机制的研究必将成为未来食品活性组分研究的热点,植源性 ELNs 和乳源性 EVs 也必将作为一种重要的新型食品营养活性组分,在食品、医学等领域得到广泛应用。

参 考 文 献

- [1] RAPOSO G, STOORVOGEL W. Extracellular vesicles: Exosomes, microvesicles, and friends[J]. The Journal of Cell Biology, 2013, 200(4): 373-383.
- [2] PERUT F, RONCUZZI L, BALDINI N. The emerging roles of extracellular vesicles in osteosarcoma[J]. Frontiers in Oncology, 2019, 9: 1342.
- [3] WOITH E, FUHRMANN G, MELZIG M F. Extracellular vesicles-connecting kingdoms[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2019, 20(22): 5965.
- [4] REN J H, HE W S, ZHENG L F, et al. From structures to functions: Insights into exosomes as promising drug delivery vehicles[J]. Biomaterials Science, 2016, 4(6): 910-921.
- [5] ZHOU X X, XIE F, WANG L, et al. The function and clinical application of extracellular vesicles in innate immune regulation[J]. Cellular & Molecular Immunology, 2020, 17(4): 323-334.
- [6] KALLURI R, LEBLEU V S. The biology, function, and biomedical applications of exosomes[J]. Science, 2020, 367(6478): eaau6977.
- [7] BANG C, THUM T. Exosomes: New players in cell-cell communication [J]. The International Journal of Biochemistry & Cell Biology, 2012, 44 (11): 2060-2064.
- [8] 王莉, 李静钰, 徐锐, 等. 植物外泌体的研究进展[J]. 国际药学研究杂志, 2020, 47(8): 614-618.
- [9] WANG L, LI J Y, XU R, et al. Plant-derived exosomes: Research progress[J]. International Journal of Pharmacy Research, 2020, 47(8): 614-618.
- [10] NATHAN C. Nonresolving inflammation redux[J]. Immunity, 2022, 55(4): 592-605.
- [11] LIBBY P. Inflammatory mechanisms: The molecular basis of inflammation and disease[J]. Nutrition Reviews, 2007, 65(12): 140-146.
- [12] CHAN B D, WONG W Y, LEE M M, et al. Exosomes in inflammation and inflammatory disease[J]. Proteomics, 2019, 19(8): e1800149.
- [13] LIU B L, LU Y Z, CHEN X Y, et al. Protective role of shiitake mushroom -derived exosome -like nanoparticles in D -galactosamine and lipopolysaccharide-induced acute liver injury in mice[J]. Nutrients, 2020, 12(2): 477.
- [14] LI B, HOCK A, WU R Y, et al. Bovine milk-derived exosomes enhance goblet cell activity and prevent the development of experimental necrotizing enterocolitis[J]. PLoS One, 2019, 14(1): e0211431.
- [15] JEOESEN D, HVAM M L, PRIMDAHL-BENGTSON B, et al. Comparative analysis of discrete exo-

- some fractions obtained by differential centrifugation[J]. *Journal of Extracellular Vesicles*, 2014, 3: 25011.
- [15] STANLY C, FIUME I, CAPASSO G, et al. Isolation of exosome-like vesicles from plants by ultracentrifugation on Sucrose/Deuterium Oxide (D2O) density cushions[J]. *Methods in Molecular Biology*, 2016, 1459: 259–269.
- [16] HONG C S, FUNK S, MULLER L, et al. Isolation of biologically active and morphologically intact exosomes from plasma of patients with cancer[J]. *Journal of Extracellular Vesicles*, 2016, 5: 29289.
- [17] HONK C S, FUNK S, WHITESIDE T. Isolation of biologically active exosomes from plasma of patients with cancer[J]. *Methods in Molecular Biology*, 2017, 1633: 257–265.
- [18] MULLER L, HONG C S, STOLZ D B, et al. Isolation of biologically-active exosomes from human plasma[J]. *Journal Immunology Methods*, 2014, 411: 55–65.
- [19] WU Y S, WANG Y Q, LU Y J, et al. Microfluidic technology for the isolation and analysis of exosomes[J]. *Micromachines*, 2022, 13(10): 1571.
- [20] KIRBAS O K, BOZKURT B T, ASUTAY A B, et al. Optimized isolation of extracellular vesicles from various organic sources using aqueous two-phase system[J]. *Scientific RepoRtS*, 2019, 9(1): 19159.
- [21] ZHANG L, HE F J, GAO L N, et al. Engineering exosome-like nanovesicles derived from asparagus cochinchinensis can inhibit the proliferation of hepatocellular carcinoma cells with better safety profile[J]. *International Journal of Nanomedicine*, 2021, 16: 1575–1586.
- [22] BRUNO S P, PAOLINI A, D'ORIA V, et al. Extracellular vesicles derived from citrus sinensis modulate inflammatory genes and tight junctions in a human model of intestinal epithelium[J]. *Frontiers in Nutrition*, 2021, 8: 778998.
- [23] XIAO J, FENG S Y, WANG X, et al. Identification of exosome-like nanoparticle-derived microRNAs from 11 edible fruits and vegetables[J]. *PeerJ*, 2018, 6: e5186.
- [24] SAMUEL M, CHISANGA D, LIEM M, et al. Bovine milk-derived exosomes from colostrum are enriched with proteins implicated in immune response and growth[J]. *Scientific RepoRtS*, 2017, 7(1): 5933.
- [25] NING B, HUANG Z, YOUNGQUIST B M, et al. Liposome-mediated detection of SARS-CoV-2 RNA-positive extracellular vesicles in plasma[J]. *Nature Nanotechnology*, 2021, 16(9): 1039–1044.
- [26] LI D, YAO X L, YUE J X, et al. Advances in bioactivity of microRNAs of plant-derived exosome-like nanoparticles and milk-derived extracellular vesicles[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2022, 70(21): 6285–6299.
- [27] UMEZU T, TAKANASHI M, MURAKAMI Y, et al. Acerola exosome-like nanovesicles to systemically deliver nucleic acid medicine via oral administration[J]. *Molecular Therapy: Methods & Clinical Development*, 2021, 21: 199–208.
- [28] ARNTZ O J, PIETERS B C H, OLIVEIRA, M C, et al. Oral administration of bovine milk derived extracellular vesicles attenuates arthritis in two mouse models[J]. *Molecular Nutrition & Food Research* 2015, 59(9): 1701–1712.
- [29] ABRAHAM A M, WIEMANN S, AMBREEN G, et al. Cucumber-derived exosome-like vesicles and planterystals for improved dermal drug Delivery[J]. *Pharmaceutics*, 2022, 14(3): 476.
- [30] CHEN Q B, LI Q, LIANG Y Q, et al. Natural exosome-like nanovesicles from edible tea flowers suppress metastatic breast cancer via ROS generation and microbiota modulation[J]. *Acta Pharmaceutica Sinica B*, 2022, 12(2): 907–923.
- [31] BHATTACHARJEE S. DLS and zeta potential – What they are and what they are not?[J]. *Journal of Controlled Release*, 2016, 235: 337–351.
- [32] RETAMAL MARIN R R, BABICK F, HILLEMANN L. Zeta potential measurements for non-spherical colloidal particles – Practical issues of characterisation of interfacial properties of nanoparticles[J]. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 2017, 532: 516–521.
- [33] JU S W, MU J Y, DOKLAND T, et al. Grape exosome-like nanoparticles induce intestinal stem cells and protect mice from DSS-induced colitis[J]. *Molecular Therapy*, 2013, 21(7): 1345–1357.
- [34] THERY C, OSTROWSKI M, SEGURA E. Membrane vesicles as conveyors of immune responses[J]. *Nature Reviews Immunology*, 2009, 9(8): 581–593.
- [35] 朱珍珠, 江睿, 廖柳月, 等. 植物胞外囊泡的结构、

- 生物活性及其在食药递送方面的应用[J]. 食品工业科技, 2022, 43(2): 422-432.
- ZHU Z Z, JIANG R, LIAO L Y, et al. Advance in structure and bioactivities of plant extracellular vesicles and its application in food and drug industry [J]. Science and Technology of Food Industry, 2022, 43(21): 422-432.
- [36] ZU M H, XIE D C, CANUP B S B, et al. 'Green' nanotherapeutics from tea leaves for orally targeted prevention and alleviation of colon diseases[J]. Biomaterials, 2021, 279: 121178.
- [37] TENG Y, REN Y, SAYED M, et al. Plant-derived exosomal MicroRNAs shape the gut microbiota [J]. Cell Host & Microbe, 2018, 24(5): 637-652.
- [38] KALLURI R, LEBLEU V S. The biology, function, and biomedical applications of exosomes[J]. Science, 2020, 367(6478): eaau6977.
- [39] YANG M, SONG D H, CAO X Y, et al. Comparative proteomic analysis of milk-derived exosomes in human and bovine colostrum and mature milk samples by iTRAQ-coupled LC-MS/MS [J]. Food Research International, 2017, 92: 17-25.
- [40] LI B, HOCK A, WU R Y, et al. Bovine milk-derived exosomes enhance goblet cell activity and prevent the development of experimental necrotizing enterocolitis[J]. PLoS One, 2019, 14(1): e0211431.
- [41] WANG Q L, ZHUANG X Y, MU J Y, et al. Delivery of therapeutic agents by nanoparticles made of grapefruit-derived lipids [J]. Nature Communication, 2013, 4: 1867.
- [42] PEREZ-BERMEDEZ P, BLES A J, SORIANO J M, et al. Extracellular vesicles in food: Experimental evidence of their secretion in grape fruits[J]. European Journal of Pharmaceutical Sciences, 2017, 98: 40-50.
- [43] KOSAKA N, LZUMI H, SEKINE K, et al. MicroRNA as a new immune-regulatory agent in breast milk[J]. Silence, 2010, 1(1): 7.
- [44] PERUT F, RONCUZZI L, AVNET S, et al. Strawberry-derived exosome-like nanoparticles prevent oxidative stress in human mesenchymal stromal cells[J]. Biomolecules, 2021, 11(1): 87.
- [45] AHIN F, KOCAK P, GUNES M Y, et al. *In vitro* wound healing activity of wheat-derived nanovesicles [J]. Applied Biochemistry and Biotechnology, 2019, 188(2): 381-394.
- [46] SUNDARAM K, MU J Y, KUMAR A, et al. Garlic exosome-like nanoparticles reverse high-fat diet induced obesity via the gut/brain axis[J]. Theranostics, 2022, 12(3): 1220-1246.
- [47] XU F Y, MU J Y, TENG Y, et al. Restoring oat nanoparticles mediated brain memory function of mice fed alcohol by sorting inflammatory dectin-1 complex into microglial exosomes[J]. Small, 2022, 18(6): e2105385.
- [48] FUJITA D, ARAI T, KOMORI H, et al. Apple-derived nanoparticles modulate expression of organic-anion-transporting polypeptide (OATP) 2B1 in Caco-2 Cells[J]. Molecular Pharmaceutics, 2018, 15(12): 5772-5780.
- [49] WANG L F, SHI Z X, WANG X Y, et al. Protective effects of bovine milk exosomes against oxidative stress in IEC-6 cells[J]. European Journal of Nutrition, 2021, 60(1): 317-327.
- [50] TONG L J, HAO H N, ZHANG X Y, et al. Oral administration of bovine milk-derived extracellular vesicles alters the gut microbiota and enhances intestinal immunity in mice[J]. Molecular Nutrition & Food Research, 2020, 64(8): e1901251.
- [51] TAO H N, GAO H Y, ZHANG H, et al. Yak-milk-derived exosomes promote proliferation of intestinal epithelial cells in an hypoxic environment[J]. Journal of Dairy Science, 2019, 102(2): 985-996.
- [52] DONG P, ZHANG Y, YAN D Y, et al. Protective effects of human milk-derived exosomes on intestinal stem cells damaged by oxidative stress[J]. Cell Transplantation, 2020, 29: 1-8.
- [53] ONNEVELD M I, HERWIJNEN M J C, FERNANDEZ-GUTIERREZ M M, et al. Human milk extracellular vesicles target nodes in interconnected signaling pathways that enhance oral epithelial barrier function and dampen immune responses[J]. Journal of Extracellular Vesicles, 2021, 10(5): e12071.
- [54] IBRAHIM H M, MOHAMMED-GEBA K, et al. Camel milk exosomes modulate cyclophosphamide-induced oxidative stress and immuno-toxicity in rats [J]. Food & Function, 2019, 10(11): 7523-7532.
- [55] TENG Y, REN Y, SAYED M, et al. Plant-derived exosomal microRNAs shape the gut microbiota [J]. Cell Host & Microbe, 2018, 24(5): 637-652.
- [56] MUNIR J, LEE M, RYU S. Exosomes in food: Health benefits and clinical relevance in diseases[J].

- American Society for Nutrition, 2020, 11(3): 687–696.
- [57] DEORA A, HEGDE S, LEE J, et al. Transmembrane TNF-dependent uptake of anti-TNF antibodies[J]. *MAbs*, 2017, 9(4): 680–695.
- [58] AQUILANO K, CECI V, GISMONDI A, et al. Adipocyte metabolism is improved by TNF receptor-targeting small RNAs identified from dried nuts[J]. *Communications Biology*, 2019, 2: 317.
- [59] ZHUANG X Y, DENG Z B, MU J Y, et al. Ginger-derived nanoparticles protect against alcohol-induced liver damage[J]. *Journal of Extracellular Vesicles*, 2015, 4: 28713.
- [60] ZHUANG M Z, XIAO B, WANG H, et al. Edible ginger-derived nano-lipids loaded with doxorubicin as a novel drug-delivery approach for colon cancer therapy[J]. *Molecular Therapy*, 2016, 24(10): 1783–1796.
- [61] LIU C, YAN X Q J, ZHANG Y J, et al. Oral administration of turmeric-derived exosome-like nanovesicles with anti-inflammatory and pro-resolving bioactions for murine colitis therapy[J]. *Journal of Nanobiotechnology*, 2022, 20(1): 206.
- [62] DESAI N, GADEVAL A, KATHAE U, et al. Emerging roles and biopharmaceutical applications of milk derived exosomes[J]. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 2021, 64: 102577.
- [63] GAO R N, ZHANG R, QIAN T, et al. A comparison of exosomes derived from different periods breast milk on protecting against intestinal organoid injury[J]. *Pediatric Surgery International*, 2019, 35(12): 1363–1368.
- [64] CAI H, HUANG L Y, HONG R, et al. Momordica charantia exosome-like nanoparticles exert neuroprotective effects against ischemic brain injury via inhibiting matrix metalloproteinase 9 and activating the AKT/GSK3 β signaling pathway[J]. *Frontiers in Pharmacology*, 2022, 13: 908830.
- [65] CAO M, YAN H J, HAN X, et al. Ginseng-derived nanoparticles alter macrophage polarization to inhibit melanoma growth[J]. *Journal for Immunotherapy of Cancer*, 2019, 7(1): 326.
- [66] SHARMA D, KANNEGANTI T D. The cell biology of inflammasomes: Mechanisms of inflammasome activation and regulation[J]. *Journal of Cell Biology*, 2016, 213(6): 617–629.
- [67] LI Z W, CHEN X Y, TAO J J, et al. Exosomes regulate NLRP3 inflammasome in diseases[J]. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 2021, 9: 802509.
- [68] TRIANTAFILOU K. Enigmatic inflammasomes[J]. *Immunology*, 2021, 162(3): 249–251.
- [69] CHEN X Y, ZHOU Y, YU J J. Exosome-like nanoparticles from ginger rhizomes inhibited NLRP3 inflammasome activation[J]. *Molecular Pharmaceutics*, 2019, 16(6): 2690–2699.
- [70] CHEN X Y, LIU B L, LI X Z, et al. Identification of anti-inflammatory vesicle-like nanoparticles in honey[J]. *Journal of Extracellular Vesicles*, 2021, 10(4): e12069.
- [71] LIU B L, LI X Z, YU H, et al. Therapeutic potential of garlic chive-derived vesicle-like nanoparticles in NLRP3 inflammasome mediated inflammatory diseases[J]. *Theranostics*, 2021, 11(19): 9311–9330.
- [72] DESAI N, GADEVAL A, KATHAE U, et al. Emerging roles and biopharmaceutical applications of milk derived exosomes[J]. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 2021, 64: 102577.
- [73] AHN G, KIM Y H, AHN J Y. Multifaceted effects of milk-exosomes (Mi-Exo) as a modulator of scar-free wound healing[J]. *Nanoscale Advances*, 2021, 3(2): 528–537.
- [74] ZHAO W J, BIAN Y P, WANG Q H, et al. Blueberry-derived exosomes-like nanoparticles ameliorate nonalcoholic fatty liver disease by attenuating mitochondrial oxidative stress[J]. *Acta Pharmacologica Sinica*, 2022, 43(3): 645–658.
- [75] DE ROBERTIS M, SARRA A, DORIA V, et al. Blueberry-derived exosome-like nanoparticles counter the response to TNF- α -induced change on gene expression in EA.hy926 Cells[J]. *Biomolecules*, 2020, 10(5): 742.
- [76] DHILLON A S, HAGAN S, RATH Q, et al. MAP kinase signalling pathways in cancer[J]. *Oncogene*, 2007, 26(22): 3279–3290.
- [77] KAMINSKA B. MAPK signalling pathways as molecular targets for anti-inflammatory therapy—from molecular mechanisms to therapeutic benefits[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2005, 1754(1/2): 253–262.
- [78] CARGNELLO M, ROUX P P. Activation and function of the MAPKs and their substrates, the MAPK-activated protein kinases[J]. *Microbiology and*

- Molecular Biology Reviews, 2011, 75(1): 50–83.
- [79] KIM E K, CHOI E J. Pathological roles of MAPK signaling pathways in human diseases[J]. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Molecular Basis of Disease, 2010, 1802(4): 396–405.
- [80] O'NEIL J D, AMMIT A J, CLARK A R. MAPK p38 regulates inflammatory gene expression via tristetraprolin: Doing good by stealth[J]. The International Journal of Biochemistry & Cell Biology, 2018, 94: 6–9.
- [81] ZONNEVELD M I, HERWIJNEN M J C, FERNANDEZ-GUTIERREZ M M, et al. Human milk extracellular vesicles target nodes in interconnected signalling pathways that enhance oral epithelial barrier function and dampen immune responses[J]. Journal of Extracellular Vesicles, 2021, 10(5): e12071.
- [82] ZONNEVELD M I, HERWIJNEN M J C, FERNANDEZ-GUTIERREZ M M, et al. Human milk extracellular vesicles target nodes in interconnected signalling pathways that enhance oral epithelial barrier function and dampen immune responses[J]. Journal of Extracellular Vesicles, 2021, 10(5): e12071.
- [83] MU J Y, ZHUANG X Y, WANG Q L, et al. Interspecies communication between plant and mouse gut host cells through edible plant derived exosome-like nanoparticles [J]. Molecular Nutrition & Food Research, 2014, 58(7): 1561–1573.
- [84] LEI C, MU J Y, TENG Y, et al. Lemon exosome-like nanoparticles –manipulated probiotics protect mice from *C. diff* infection[J]. iScience, 2020, 23(10): 101571.
- [85] GU Z L, LI F Y, LIU Y H, et al. Exosome-like nanoparticles from *Lactobacillus rhamnosus* GG protect against alcohol-associated liver disease through intestinal aryl hydrocarbon receptor in mice[J]. Hepatology Communications, 2021, 5(5): 846–864.
- [86] SUNDARAM K, MILLER D P, LUMAR A, et al. Plant –derived exosomal nanoparticles inhibit pathogenicity of *Porphyromonas gingivalis*[J]. iScience, 2019, 21: 308–327.
- [87] LIU Y, TAN M L, ZHU W J, et al. *In vitro* effects of tartary buckwheat-derived nanovesicles on gut microbiota[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2022, 70(8): 2616–2629.
- [88] STEWAET A G, BEART A G. Inflammation: Maladies, models, mechanisms and molecules[J]. British Journal of Pharmacology, 2016, 173(4): 631–634.
- [89] SUN X Y, GAO J, MENG X, et al. Polarized macrophages in periodontitis: Characteristics, function, and molecular signaling[J]. Frontiers Immunology, 2021, 12: 763334.
- [90] PENG K J, DENG N H, MENG Y, et al. Alpha-momorcharin inhibits proinflammatory cytokine expression by M1 macrophages but not anti-inflammatory cytokine expression by M2 macrophages [J]. Journal of Inflammation Research, 2022, 15: 4853–4872.
- [91] WANG B M, ZHUANG X Y, DENG Z B, et al. Targeted drug delivery to intestinal macrophages by bioactive nanovesicles released from grapefruit [J]. Molecular Therapy, 2014, 22(3): 522–534.
- [92] TENG Y, MU J Y, HU X, et al. Grapefruit-derived nanovectors deliver miR-18a for treatment of liver metastasis of colon cancer by induction of M1 macrophages[J]. Oncotarget, 2016, 7(18): 25683–25697.
- [93] ZHANG M Z, 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.
- [94] YOU J Y, KANG S J, RHEE W J. Isolation of cabbage exosome-like nanovesicles and investigation of their biological activities in human cells[J]. Bioactive Materials, 2021, 6(12): 4321–4332.
- [95] IZUMI H, TSUDA M, SATO Y, et al. Bovine milk exosomes contain microRNA and mRNA and are taken up by human macrophages[J]. Journal of Dairy Science 2015, 98(5): 2920–2933.
- [96] SANTOS –COQUIHAT A, GONZALEZ M L, CLEMENTE–MORAGON A, et al. Goat milk exosomes as natural nanoparticles for detecting inflammatory processes by optical imaging[J]. Small, 2022, 18(6): e2105421.

The Mechanism of Chronic Inflammation Regulated by Plant and Milk-derived Extracellular Vesicles

Cao Guifang¹, Li Dan¹, Yi Gaoyang¹, Yang Yongli², Yao Xiaolin^{1*}

(¹School of Food Science and Engineering, Shaanxi University of Science and Technology, Xi'an 710021

²School of Life Science and Technology, Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710049)

Abstract Extracellular vesicles (EVs) are vesicle complex secreted by animal and plant cells, and exert a variety of physiological activities due to rich in multiple active components, such as lipids, proteins and RNA. Inflammation is a kind of immune response caused by the external stimulation, and chronic inflammation occurs when the balance of pro-inflammatory factors and anti-inflammatory factors is disrupted. Studies have shown that exosome-like nanovesicles (ELNs) in plant-derived EVs and milk-derived EVs contain different kinds of active components, which can delay the progression of inflammatory response and the occurrence of inflammation related diseases by inhibiting the secretion of pro-inflammatory cytokines, and up-regulating the expression of anti-inflammatory factors and immune cytokines. Accordingly, the extraction and characterization methods of plant-derived ELNs and milk-derived EVs were summarized in this review. Importantly, their roles in regulation of inflammation from the aspects of inhibition of NF- κ B pathway, oxidative stress and related MAPK pathway conduction, regulation of intestinal microbial composition and intestinal stem cell growth, and controlling of macrophage growth were explored. The review will provide reference for further exploring the biological activities of plant-derived ELNs and milk-derived EVs.

Keywords plant-derived exosome-like nanovesicles; milk-derived extracellular vesicles; extraction; purification; anti-inflammation; development