

· 学术探讨 ·

基于外泌体的精准信使靶向性和中医药超分子“气析”理论的 中医药现代化实验研究思路与策略探索

陈定芳, 吴月峰, 李海英, 邓凯文, 孟蕾, 王韧, 肖美凤, 周逸群, 潘雪*, 贺福元*
(湖南中医药大学药学院, 中药成药性与制剂制备湖南省重点实验室,
中医药超分子机理与数理特征化实验室, 长沙 410208)

[摘要] 外泌体是由生物体内各种细胞主动分泌的脂质双分子层膜性囊泡, 似纳米粒, 具有信使靶向性, 与中医药超分子“气析”理论结合可构建中医药现代化实验研究思路与策略。外泌体由各细胞分泌, 膜内含核酸、蛋白质、脂质及小分子代谢物质等, 亲本能精准协调各细胞间的功能, 浓缩传递亲本细胞的功能信息, 是体现细胞功能的简洁形式; 同时荷载了中医药超分子“气析”理论的“印迹模板”, 若对其包裹的基因-蛋白质-脂质-小分子间的“印迹模板”运载规律进行研究, 可建立起中医药理论现代化实验研究思路和策略, 揭示机体经络脏腑功能。笔者首先对外泌体的现状, 包括发现、分泌、特点、功能、归属、摄取、研究方法、应用现状进行综述, 阐述其精准信使靶向性的运载工具天然属性, 体现出了经络脏腑微观物质的运行规律; 其次, 探讨其作为中医药超分子“气析”理论的“印迹模板”重要载体, 融合中医药超分子化学研究方法提出中医药经络脏腑与归经的微观物质基础、中药复方配伍、中药靶向制剂靶向性的实验研究思路与策略。

[关键词] 外泌体; 中医药理论; 印迹模板; 超分子“气析”理论; 靶向性; 靶向制剂; 方剂配伍

[中图分类号] R22;R28;R96;R857.3 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2022)07-0198-09

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20211846

[网络出版地址] <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20210723.1208.002.html>

[网络出版日期] 2021-07-23 16:56

Exploration of Ideas and Strategies for TCM Modernization Experimental Research Based on Precise Messenger Targeting of Exosomes and TCM Supramolecular "Qi Chromatography" Theory

CHEN Ding-fang, WU Yue-feng, LI Hai-ying, DENG Kai-wen, MENG Lei, WANG Ren,
XIAO Mei-feng, ZHOU Yi-qun, PAN Xue*, HE Fu-yuan*
(School of Pharmacy, Hunan Provincial Key Laboratory of Drugability and Preparation Modification of
Traditional Chinese Medicine, Supramolecular Mechanism and Mathematic-physics Characterization for
Chinese Materia Medica, Hunan University of Chinese Medicine, Changsha 410208, China)

[Abstract] Exosomes are lipid bilayer membranous vesicles actively secreted by various cells in the organism, which are like nanoparticles and have messenger targeting. Combining with the theory of supramolecular "Qi chromatography" of traditional Chinese medicine (TCM), research ideas and strategies of

[收稿日期] 2021-05-08

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81703824, 81803729, 81903759, 81874507); 湖南省科技厅重点实验室建设项目(2016TP1017); 湖南省自然科学基金项目(2019JJ50430); 湖南省教育厅创新平台开放基金项目(18K071); 湖南省“国内一流培育学科”药理学2018年开放基金项目(2018YX06); 湖南中医药大学科研基金项目(2019XJJ024); 湖南中医药大学药理学一流学科基金项目(2021YX15)

[第一作者] 陈定芳, 在读硕士, 从事中药药理学、中药药剂学、中医药超分子与数理特征化研究, E-mail: 1587045144@qq.com

[通信作者] * 潘雪, 讲师, 从事中药药理学、中药复方物质基础及超分子化学研究, E-mail: 405465029@qq.com;

* 贺福元, 教授, 从事中药药理学、中药药剂学、中医药超分子与数理特征化研究, E-mail: pharmsharking@tom.com

modernization of TCM can be constructed. Exosomes are secreted by cells, and the membrane contains nucleic acids, proteins, lipids and small molecular metabolites and others, which can accurately coordinate the functions of each cell, concentrate and transmit the functional information of the parent cell, and is the concise form of reflecting cell functions. At the same time, it is loaded with the "imprinted templates" of the supramolecular "Qi chromatography" theory of TCM. If the "imprinted templates" carrying rules among the gene-protein-lipid-small molecules wrapped in it is studied, the modern experimental research ideas and strategies of TCM theory can be established for revealing the functions of the body's meridians and viscera. Firstly, the present situation of exosomes, including discovery, secretion, characteristics, functions, attribution, uptake, research methods and application status, were reviewed in this paper. And the natural properties of its precise messenger targeted delivery vehicle were elaborated, reflecting the operation law of microscopic substances in meridians and viscera. Secondly, to explore it as an important carrier of the concentrated "imprinted templates" of the supramolecular "Qi chromatography" theory of TCM, and integrating the research methods of exosomes and supramolecular chemistry of TCM, this paper proposes experimental research ideas and strategies on the microscopic material basis of meridians and viscera, compatibility of TCM compound, and targeting of TCM targeted preparations.

[Keywords] exosomes; theory of traditional Chinese medicine; imprinting templates; supramolecular "Qi chromatography" theory; targeting; targeted preparations; formula compatibility

外泌体是由多种细胞分泌的纳米级别的微小囊泡状结构,内含来源于亲本细胞相关的核酸、蛋白质及脂质等生物分子,属于一种生物超分子体^[1]。其具备脂质双分子层结构,可以通过自分泌、旁分泌等方式与远距离的细胞进行物质和信息交流^[2]。外泌体内容物和表面蛋白的不同使其具备高度异质性和精准靶向性,是浓缩了的亲本细胞信息聚集载体。现已经发现其内容物与免疫反应、病毒致病性、妊娠、心血管疾病、中枢神经系统相关疾病和癌进展联系密切,产生多种生理病理作用^[3]。

前期本课题组提出中医药超分子“气析”理论,建立中药超分子“印迹模板”的研究方法^[4],阐明了中医药学科所面临3个重大前沿科学问题与3个重大工程技术难题破解的策略^[5],若再与外泌体的精确信使靶向性结合,就可以建立明确的中医药现代化实验研究策略。人体与中药均为自然界进化产生的生物超分子体,其生理病理作用均遵循超分子“印迹模板”作用规律,而“印迹模板”的浓缩与传递的载体工具可能是外泌体,若能获得外泌体精准信使靶向性的“印迹模板”特征,可建立中医药理论研究的具体实验思路与策略,为破解中医药现代化难题提供有益借鉴。基于此,笔者拟对外泌体的国内外研究现状进行系统梳理,并融合中医药超分子“气析”理论和研究方法,阐明中医药理论,特别是对中医经络脏腑物质基础、中药归经、中药复方配伍、中药靶向性制剂的实验研究提供思路和策略,

以促进中医药现代化研究方法的突破。

1 外泌体的研究现状

1.1 外泌体的产生、结构、功能及识别

1.1.1 外泌体的发现和分泌 1987年JOHNSTONE等最早在绵羊网织红细胞中发现了外泌体,认为其是“细胞尘埃”,专门运输、排除细胞代谢废物。然而,随着研究的深入和组学技术的发展,研究者发现外泌体是细胞外囊泡(EVs)一个重要的亚群,直径40~160 nm(平均值约100 nm)^[3],几乎所有细胞都能分泌,在细胞之间的通讯和物质交流方面起着重要作用^[6]。目前外泌体的生物发生研究最多的是内体途径,其生物机制被研究者归纳为内吞体分选转运复合体(ESCRT)依赖和ESCRT非依赖2种机制。细胞分泌外泌体一般经过早期分选核内体(ESEs)成熟形成晚期分选核内体(LSEs),再形成多囊泡体(MVBs)后以外泌体形式外排,具体过程为细胞质膜的第1次内陷形成ESEs,不断选择性装载亲本细胞的各种生物活性物质,而后在ESCRT和其他相关蛋白的控制下ESEs成熟形成LSEs, LSEs经过细胞膜的2次内陷形成MVBs, MVBs重新与细胞膜融合和裂解,最后MVBs膜内的物质以外泌体的形式外排到外部,随体液分布于全身各处组织或细胞,包括血液、眼泪、尿液、唾液、乳汁、腹水、羊水等。已有研究发现多种蛋白质、磷脂、神经酰胺、鞘磷脂酶等参与外泌体的生物发生过程,但外泌体形成的确切机制还需进一步探索^[7]。

1.1.2 外泌体的特性和功能 不同亲本细胞遗传物质和代谢产物的差异使得所衍生的外泌体具有较大异质性,主要体现在遗传物质和代谢产物的类别和含量上。在外泌体形成过程中可与亲本细胞内的其他囊泡和细胞器之间进行物质交流,脱氧核糖核酸(DNA)、信使核糖核酸(mRNA)、微小RNA(miRNA)、关联蛋白、热激蛋白等一系列“货物”进入外泌体膜内,同时MVBs限制膜不均匀内陷导致外泌体尺寸和内容物含量的差异^[8];外泌体的脂质双分子层结构能保持“货物”在膜内良好的生物稳定性和相容性,可与远距离受体细胞结构相似的细胞膜表面蛋白结合,激活受体细胞并传递功能蛋白、脂质和miRNA等活性分子进行表观遗传重编程^[9],体现出外泌体的精准信使靶向性。不同的亲本细胞自发或在一定刺激条件下所衍生的外泌体能对受体细胞产生一系列功能,如免疫调节^[10]、微环境的调节和稳定^[11]、凝血机制^[12]、细胞发生发展^[13]、细胞分化^[14]、介导细胞间的通讯交流^[15]等。

1.1.3 外泌体的类型与摄取 根据外泌体是否经过人工修饰将其分为天然外泌体和工程外泌体,天然外泌体还可分为动物来源的外泌体和植物来源的外泌体。由于外泌体是在正常和肿瘤条件下产生的,动物来源的外泌体又被进一步分为正常外泌体和肿瘤外泌体。目前,外泌体主要根据来源进行分类^[16],如间充质干细胞外泌体、肿瘤细胞外泌体等,这种分类并没有详细分析各种外泌体的特性和功能应用,未来可根据外泌体的功能特性、生物分布和免疫原性等方面进一步细分。外泌体的异质性可反映其大小、内容物含量、对受体细胞的功能影响及来源,例如,生姜外泌体中含有较多的活性成分,包括6-姜烯酚和6-姜辣素等^[17];乳腺癌细胞衍生外泌体的蛋白质组学分析可显示亲本细胞是上皮样细胞还是间充质样细胞^[18]。尽管已经发现了外泌体的几种摄取机制^[19-20],主要有吞噬作用、巨胞饮作用、受体介导的内吞作用、质膜融合,但受体细胞摄取外泌体的机制尚不完全清楚,见图1。

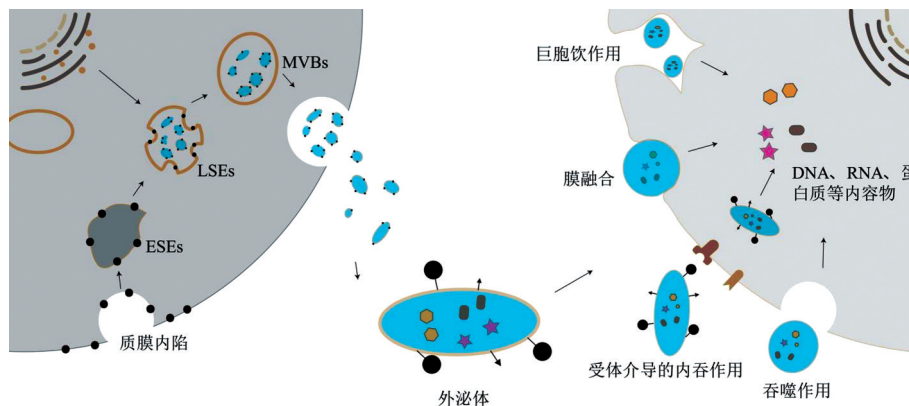


图1 外泌体的分泌和摄取

Fig. 1 Secretion and uptake of exosomes

1.2 外泌体的研究方法

1.2.1 外泌体的提取、分离与纯化 EVs包括凋亡小体、微囊泡和外泌体,由于三者之间体积相近,彼此重叠、尺寸小及外泌体本身的异质性^[21],要从复杂的生物样品中分离出高纯度外泌体需要采用适当的分离方法,目前有超速离心法、免疫捕获法、尺寸排阻色谱法、聚合物沉淀法、超滤法、微流控芯片法和新兴的纳米材料分离方法等。单用一种方法并不能高效率去除各类脂蛋白、乳糜微粒及蛋白聚合物等成分,实验过程中往往需要根据实验目的和应用的的不同选择合适的分离方法^[3],同时结合不同分离方法以获得达到实验要求的完整外泌体,如KYUNG等^[22]为了弥补基于聚合物沉淀法的试剂盒的不足,尝试将超速离心法与试剂盒相结合,成功

从乳腺癌患者的血清中提取出外泌体。

1.2.2 外泌体的稳定性与储存 虽然体内条件下外泌体的脂质双分子层结构能有效保护内容物而避免被降解,但在体外条件下却难以储存,因此需要合适的储存方法以维持外泌体的生物活性,以便后续的功能分析和临床应用^[23]。目前应用的防护技术主要有冷藏法、冻干法和喷雾干燥法。但值得一提的是,外泌体储存时间和条件、分离鉴定方法的差异都会对其稳定性产生一定影响,因此仍需进一步探索更完善的储存方法。如AQIL等^[24]发现牛奶中分泌的外泌体在-80℃条件下存储6个月后稳定性良好,载药率也较为稳定。外泌体最适宜的综合储存方法为-80℃下存储于硅化物容器的磷酸盐缓冲液中^[25-26],与其在较高温度下储存相比,-80℃

储存时其形态和生物活性变化较小^[25-26]。

1.2.3 外泌体的鉴定 外泌体鉴定主要通过检测其形态大小和特异性标志物两方面来完成^[27],其中四跨膜蛋白 CD9、CD81、CD63、脂筏结构蛋白(Flotillin)、肿瘤易感基因 101 蛋白(TSG101)、凋亡连接基因-2-相互作用蛋白 X(ALIX)等蛋白和神经酰胺已被用作外泌体特异标记物^[28]。其主要鉴定技术包括①电镜技术:利用电子产生分辨率低至纳米级的外泌体形态图像;②蛋白质免疫印迹法(Western blot):根据抗原-抗体的特异性结合检测外泌体中某种特定蛋白进行鉴定;③流式细胞术:采用流式细胞仪对外泌体进行快速测量和多参数检测;④纳米颗粒跟踪技术:可测算外泌体群体直径分布和数量;⑤液相色谱-质谱联用技术:液质联用仪具有高分离度、高选择性和高灵敏度等特点,可分析外泌体中蛋白质、脂质及代谢物等微量物质^[29]。此外,还有其他新技术,如微流控芯片技术、表面等离子体共振技术、微型核磁共振技术等。外泌体携带亲本细胞丰富的遗传信息和代谢产物提供了疾病诊断和预后的观察窗口,外泌体鉴定后可通过分析其内容物及特异标记物能判断出对应细胞、组织乃至器官的状态和功能变化。值得重视的是,外泌体作为一种生物超分子体,鉴定时容易和 DNA 碎片、小 EVs 等其他体积相近的超分子体混淆^[1],因此外泌体的准确鉴定对后续研究极为重要。

1.3 外泌体的临床应用 已有大量实验对外泌体的生物学特性和功能进行研究,加速了其在疾病早期预防诊断、治疗、预后和疗效评估等方面的临床应用。外泌体几乎分布于所有生物液中,所携带的生物活性分子类别、含量及表达差异是疾病诊断和预后的基础,可通过纵向取样法进行液体活检从而检测疾病的发生发展过程^[30]。WANG 等^[31]结合试剂盒和离心法富集得到烟雾病患者脑脊液中的外泌体,实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)验证结果表明 miRNA-3679-5p、miRNA-6165、miRNA-6760-5p 和 miRNA-574-5p 在区分烟雾病患者和正常人方面具有较高的敏感性和特异性,可以作为诊断烟雾病和评估外泌体临床作用的新型生物标志物;血清外泌体中同源异型框基因反义基因间 RNA(HOTAIR)可用作多形性胶质母细胞瘤新的预后和诊断生物标志物^[32]。外泌体对疾病的诊断范围包括心血管疾病、中枢神经系统疾病和癌症,并逐渐扩展到肝脏、肾脏和肺等其他部位疾病^[33-34]。外泌体的脂质膜和 CD47 蛋白使其避免免疫排斥反

应^[35],其本身作药物或作为运送药物的载体可穿过血脑屏障被邻近或远处的靶细胞摄取并释放药物^[36](包括蛋白质、miRNA、DNA 分子药物、化学药物等),因此作为治疗剂在癌症领域被积极探索。如骨髓间充质干细胞衍生的外泌体本身就具有治疗作用^[37];LOU 等^[38]通过间充质干细胞衍生的外泌体运输已知的肝细胞癌抑癌基因 miRNA-122,结果体内外实验证实了外泌体负载的 miRNA-122 可改变其靶基因表达,导致肝细胞的自噬和细胞周期的阻滞,进而抑制肝细胞的增殖。

外泌体的异质性、分布广泛性、生物相容性和精准信使靶向性等特点与中医药理论对物质基础的要求相一致^[39],其超分子属性亦体现出中医整体观念,使中药物质基础的研究不仅仅局限于次生代谢产物,可拓展到核酸、蛋白质等生物大分子。因此外泌体在中医药领域具有广阔的研究价值,已有学者将外泌体引入中医针灸研究领域^[40],以期为中医经络研究找到新的突破口;外泌体也可与中药有效成分共孵育出包裹药物分子的制剂,目前已开发了 β -榄香烯^[41]、雷公藤红素^[42]、姜黄素^[43]、紫草素^[44]及紫杉醇^[45]等中药活性成分的新型靶向药物。但未能进一步结合外泌体超分子特性通过自组装、自组织作用开发荷载多“药素”的中药靶向制剂^[46]。此外,植物内源性外泌体在人体内的调控作用研究也逐渐受到重视,这对中药的基原鉴定、质量控制和新药开发而言,也是一个新的研究方向^[17]。

综上所述,由生物超分子化学原理可知,外泌体分泌、摄取和产生作用过程均体现出了超分子特性:通过自组织将不同的蛋白质、脂质及核酸等大分子相互作用形成有序多分子体,从细胞这个庞大超分子聚集主体体系中分泌出来,是包含亲本细胞“印迹模板”的聚集体,同时也可作为“印迹模板”成分载体,再通过自识别和自组装与受体细胞精准结合生成新的超分子体并改变受体细胞功能状态,这种精准靶向性和信使性体现出中医药超分子“气析”作用“印迹模板”的自主作用规律,若融合中医药超分子化学的具体研究方法,可建立中医经络脏腑物质基础、中药归经、中药复方配伍和中药靶向性制剂的研究思路与策略。

2 中医药超分子“印迹模板”的“气析”作用

前期本课题组发现了中医药超分子“印迹模板”“气析”作用规律^[47]——人体和中药都是自然界的巨复超分子体,在心脏的搏血功能推动下,按照“印迹模板”有序作用。在由基因、蛋白质、酶、细胞

器、细胞、组织、器官等各功能系统构成人体的巨复超分子体的过程中,母体大分子保留了模板小分子的孔穴通道构成了经络,再联接成脏腑,小分子按“印迹模板”与经络脏腑产生“气析”作用而呈成脏象,产生“气析”作用,当这种“印迹模板”产生变化时可能导致人体发生疾病,出现与疾病“印迹模板”对应的证候,表现出“证素”特征^[48];而中药有效成分可与人体病态经络脏腑“印迹模板”进行作用,修复回归正常人体“印迹模板”,而这过程的具体执行者可能就是外泌体的印迹作用,也就是人体的十四经络所对应的脏腑细胞会分泌与之对应的外泌体,与具脏腑细胞相同“印迹模板”的中药成分群发生超分子自组装、自组织作用生成新的生物超分子体,通过间质组织的水通道对经络脏腑细胞进行投送^[49],实现精准的信使和靶向作用,起到协调和调节脏腑功能的作用,因此人体经络脏腑-超分子体“印迹模板”-外泌体-水通道就形成了中医药宏观的经络脏腑的“气析”作用现象,而外泌体的信使性、靶向性是通过“印迹模板”的印迹性实现的,可据此展开中医药理论实验研究思路和策略的探索。

3 基于外泌体和中医药“气析”理论结合的中药现代化实验研究思路与策略

3.1 经络脏腑“气析”的物质基础研究 这也就是对经络脏腑的超分子“印迹模板”特征的具体研究方法。外泌体是由中药成分、RNA、DNA、蛋白质及酶等大分子、小分子按超分子自组装、自复制和自组织原理形成的超分子体,由分子社会中“印迹模板”调控,是跟踪分析其亲本细胞、组织甚至器官功能特征的窗口。前期本课题组已经建立了中药的通用客体“印迹模板”的表征方法^[4],可结合已知经络结缔组织细胞所衍生的外泌体研究经络脏腑的主体“印迹模板”。首先,建立已知人体十四经络正常结缔组织培养方法,根据外泌体直径大小、生化特性和表面标记物的差异,结合超速离心技术、密度梯度离心技术、渗透技术等分离方法获取不同类型细胞衍生的外泌体^[50-51],利用共聚焦激光显微镜观察组织水通道中外泌体形态及其分布;其二,建立人体体液中不同外泌体的完善提取分离方法,获得各种形式的高纯度外泌体于装有磷酸水溶液的硅化容器中-80℃下储存;其三,建立人体各种外泌体的鉴别方法,采用动态光散射(DLS)分析和透射电子显微镜(TEM)鉴定外泌体并分析其生物学特征及来源,与单归经中药提取物共孵育;其四,建立不同类型外泌体与靶细胞信息的递呈方式的分

析方法,采用超分子印迹技术和平衡常数法分析已知经络脏腑细胞外泌体的信息呈递过程的“印迹模板”特征和动力学参数,计算外泌体膜内各中药成分客体“印迹模板”结合率,同时运用分子连接性指数和夹角余弦法展开外泌体“印迹模板”特征的宏观状态函数表征^[4],从而定量测算和分析经络脏腑的主体“印迹模板”通道结构特征,表征出经络脏腑“气析”的物质基础。

3.2 中药归经及功能研究 中药归经体现了中药有效成分对经络、脏腑的归属和选择性作用,药物入血后或游离或结合,结合对象除血浆中的蛋白质外,外泌体亦是药物的有效载体,可结合药物后选择性作用于靶细胞。中药有效成分对经络脏腑选择性的作用,表现为经络脏腑细胞中不同“印迹模板”的靶向性^[52]。已有研究在人体的真皮、黏膜下层及其他纤维结缔组织中发现了已知解剖学结构之外的水通道网络结构^[49],有学者判断中医经络的实质是一种水通道并做出初步窥探^[53],而外泌体作为药物“印迹模板”的超分子载体分布于细胞外液中^[54]。根据人体的十四经络分布特征,外泌体的“印迹模板”决定簇的结构类型应该分为14种类型,由各外泌体的印迹轨迹可以确定十四经络的“印迹模板”作用特征,因此可以将荧光素标记的外泌体作为探针,采用激光拍照显色分析其在体内的印迹性,从而表征出归经规律^[55-56]。此外,通过针灸调节机体内神经-体液-免疫系统网络来研究中药归经也是一种思路^[57],有研究表明针刺能刺激肥大细胞释放出外泌体,从而刺激淋巴细胞表达,使免疫活性物质分泌增加。因此通过分离针刺组与非针刺组大鼠腧穴组织衍生的外泌体,分析二者膜内代谢产物,结合网络谱效动力学参数的变化分析其代谢差异程度^[58],以针刺腧穴将外泌体代谢差异与经络脏腑联系起来,再根据腧穴与经络脏腑的属性关系来探知中药归经规律,从而在一定程度上降解直接研究中药有效成分与经络脏腑联系的困难。

3.3 中药复方配伍规律 中药复方亦是经络脏腑内部超分子“印迹模板”(“证素”)与中药分子群外部印迹模板(“药素”)按“七情和合”和“君臣佐使”调配的结果,体现出中药与人体之间“印迹模板”作用的辩证关系。而外泌体由不同经络脏腑细胞分泌并携带其遗传和代谢信息,可作为观察中药成分作用于经络脏腑“印迹模板”作用特征和规律的窗口。基于超分子“气析”理论可建立其中药复方成分及配伍的作用机制的研究方法^[59]。在本课题组

已建立的中药药性与药效的超分子化学研究基础上,通过在各种配伍形式的中药复方(客体)对机体经络脏腑(主体)的作用下,分离纯化给药前后分泌的外泌体,采用量子化学法、电子显微镜技术和Western blot测定外泌体超分子的结合模式、结构信息、分子间作用等参数对外泌体“印迹模板”特征及印迹性的影响程度进行分析^[60],比较不同配伍规律下中药复方作用经络脏腑衍生的“印迹模板”特征;此外,也可利用液质联用等技术获得外泌体的谱峰信息,计算总体平均拓扑指数表征中药复方配伍前后“印迹模板”特征,比较二者间异同,同时据此建立中药复方拓扑指数数据库,进一步筛选拓扑指数相同或相近(即具相同“印迹模板”)的客体中药有效成分,以中药成分“印迹模板”特征的确定性替代中药成分的多变性,阐明中药复方的配伍规律。

3.4 中药靶向性制剂的研究 中药制剂是与“证素”相对应“药素”的聚集体,体现共同“印迹模板”的特点,应是建立在“印迹模板”结构与作用明确的“药素”成分群基础上进行动态调配,既体现“药素”单位疗效的固有性,又体现“药素”动态的调配性制

剂^[61]。外泌体作为内源性的纳米级囊泡^[62],与脂质体、纳米颗粒等人工载体相比,在药物递送方面具有低免疫原性、靶向、无细胞毒性和强特异性的优点^[63],同时其两亲性能够分隔和溶解天然或合成的药物分子^[64],可承载多种具有相同“印迹模板”的“药素”。由于有“药素”结构共“印迹模板”的特点,外泌体载体可充分利用这一特点研究载药量更高和靶向性更强的多“药素”(多成分)控释、缓释、靶向制剂。首先,采用分子印记技术确认“药素”模板结构,选择适合的交联剂、单体及溶剂,制备的分子印记聚合物作为固定萃取的吸附剂从而得到目标“药素”,再通过外泌体与“药素”共孵育出(超分子自组织、自组装作用)与经络脏腑“印迹模板”特征相同的靶向制剂,“药素”被外泌体重组,包裹在其内、镶嵌在其中、吸附在其外,以新的外泌体“舟楫”稳定的荷载诸“药素”直达病变的经络脏腑细胞,修复回归正常人体“印迹模板”,体现了引经报使的作用,从而实现中药复方制剂主动精确靶向经络脏腑的目标。“药素”-外泌体体内作用的具体示意图见图2。

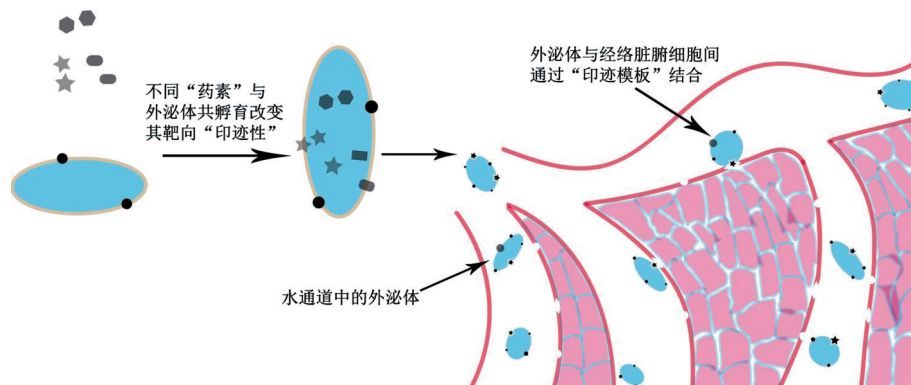


图2 外泌体的不同“药素”单位靶向制剂制备及其作用机制

Fig. 2 Preparation of targeted preparations of different "drug element" units of exosomes and its mechanism

4 结论与展望

外泌体是生命体内细胞间重要的信使传递载体,具有明显的生物相容性和精确靶向性;而超分子“气析”理论可揭示中药与人体“印迹模板”自主作用的超分子化学规律;结合已有学者提出的经络水通道结构,可以勾勒出经络的物质基础运行轮廓;机体间以水通道构成网状态联络,其中运行、分布着来自各种新母细胞的外泌体载体,该外泌体浓集了亲本细胞的生物信息,以“印迹模板”关联起的超分子的有序囊泡,精准作用于经络脏腑上靶细胞,宏观体现经络脏象,基于前期中药超分子化学实验方法^[65-66]可建立起由外泌体和超分子化学相结

合的实验研究思路。现阶段外泌体的研究多停留在实验室阶段,将外泌体应用于中医药领域还存在诸多问题,包括外泌体提纯、储存、检测、功能等研究方法专属性不强、重复性差、仪器昂贵和难以建立统一的实验规范等。但从目前的研究情况来看,外泌体可与超分子化学结合用于中医药理论的研究,随着对外泌体分子作用机制、内容物组成和靶向修饰技术研究的深入,借助超分子“气析”理论可构建起中医药理论现代化的实验研究思路与策略,在一定程度上加速中医药现代化进程。

[利益冲突] 本文不存在任何利益冲突。

[参考文献]

- [1] WERMUTH P J, JIMENEZ S A. Molecular characteristics and functional differences of anti-PM/ Scl autoantibodies and two other distinct and unique supramolecular structures known as "EXOSOMES" [J]. *Autoimmun Rev*, 2020, 19(10):102644.
- [2] WORTZEL I, DROR S, KENIFIC C M, et al. Exosome-mediated metastasis: communication from a distance[J]. *Dev Cell*, 2019, 49(3):347-360.
- [3] KALLURI R, LEBLEU V S. The biology, function, and biomedical applications of exosomes[J]. *Science*, 2020, 367(6478):eaau6977.
- [4] 周燕子,王敏存,贺玉婷,等. 鱼腥草挥发油体外代谢通用客体“印迹模板”研究[J]. *中草药*, 2021, 52(1): 75-81.
- [5] 贺福元,邓凯文,樊启猛,等. 基于中医药超分子“气析”理论破解中医药重大科学问题和工程技术难题[J]. *中草药*, 2020, 51(20):5381-5388.
- [6] 赵濛,刘志红,李金泉. 外泌体组成特征及其作为细胞通讯和分子标记的生物学作用[J]. *中国生物化学与分子生物学报*, 2016, 32(6):612-619.
- [7] MATHIEU M, MARTIN J L, LAVIEU G, et al. Specificities of secretion and uptake of exosomes and other extracellular vesicles for cell-to-cell communication[J]. *Nat Cell Biol*, 2019, 21(1):9-17.
- [8] LÄSSER C. Exosomes in diagnostic and therapeutic applications: Biomarker, vaccine and RNA interference delivery vehicle[J]. *Expert Opin Biol Ther*, 2015, 15(1):103-117.
- [9] NEDAEINIA R, MANIAN M, JAZAYERI M H, et al. Circulating exosomes and exosomal microRNAs as biomarkers in gastrointestinal cancer[J]. *Cancer Gene Ther*, 2017, 24(2):48-56.
- [10] HA D H, KIM H K, LEE J, et al. Mesenchymal stem/stromal cell-derived exosomes for immunomodulatory therapeutics and skin regeneration [J]. *Cells*, 2020, 9(5):1157.
- [11] PI Y N, XIA B R, JIN M Z, et al. Exosomes: powerful weapon for cancer nano-immunoengineering [J]. *Biochem Pharmacol*, 2021, 186:114487.
- [12] CHEN Y T, YUAN H X, OU Z J, et al. Microparticles (exosomes) and atherosclerosis [J]. *Curr Atheroscler Rep*, 2020, 22(6):23.
- [13] KOK V C, YU C C. Cancer-derived exosomes: their role in cancer biology and biomarker development[J]. *Int J Nanomedicine*, 2020, 15:8019-8036.
- [14] SHEN M Y, SHEN Y, FAN X L, et al. Roles of macrophages and exosomes in liver diseases[J]. *Front Med (Lausanne)*, 2020, 7:583691.
- [15] ZHANG J, LI S, LI L, et al. Exosome and exosomal microRNA: Trafficking, sorting, and function [J]. *Genomics Proteomics Bioinformatics*, 2015, 13(1): 17-24.
- [16] ZHANG Y, BI J, HUANG J, et al. Exosome: A review of its classification, isolation techniques, storage, diagnostic and targeted therapy applications [J]. *Int J Nanomedicine*, 2020, 15:6917-6934.
- [17] 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.
- [18] WEN S W, LIMA L G, LOBB R J, et al. Breast cancer-derived exosomes reflect the cell-of-origin phenotype [J]. *Proteomics*, 2019, 19(8):e1800180.
- [19] SIMONS M, RAPOSO G. Exosomes-vesicular carriers for intercellular communication [J]. *Curr Opin Cell Biol*, 2009, 21(4):575-581.
- [20] FENG D, ZHAO W L, YE Y Y, et al. Cellular internalization of exosomes occurs through phagocytosis[J]. *Traffic*, 2010, 11(5):675-687.
- [21] SMITH Z J, LEE C, ROJALIN T, et al. Single exosome study reveals subpopulations distributed among cell lines with variability related to membrane content[J]. *J Extracell Vesicles*, 2015, 4:28533.
- [22] KYUNG J R, LEE J Y, PARK C, et al. Isolation of small extracellular vesicles from human serum using a combination of ultracentrifugation with polymer-based precipitation[J]. *Ann Lab Med*, 2020, 40(3):253-258.
- [23] MAROTO R, ZHAO Y, JAMALUDDIN M, et al. Effects of storage temperature on airway exosome integrity for diagnostic and functional analyses [J]. *J Extracell Vesicles*, 2017, 6(1):1359478.
- [24] AQIL F, MUNAGALA R, JEYABALAN J, et al. Exosomes for the enhanced tissue bioavailability and efficacy of curcumin [J]. *AAPS J*, 2017, 19(6):1691-1702.
- [25] PARK S J, JEON H, YOO S M, et al. The effect of storage temperature on the biological activity of extracellular vesicles for the complement system [J]. *In Vitro Cell Dev Biol Anim*, 2018, 54(6):423-429.
- [26] LÓRINC Á MZ, TIMÁR C I, MAROSVÁRI K A, et al. Effect of storage on physical and functional properties of extracellular vesicles derived from neutrophilic granulocytes [J]. *J Extracell Vesicles*, 2014, 3:25465.

- [27] YANG Z, XIE J, ZHU J, et al. Functional exosome-mimic for delivery of siRNA to cancer: *In vitro* and *in vivo* evaluation [J]. *J Control Release*, 2016, 243: 160-171.
- [28] JOHNSEN K B, GUDBERGSSON J M, SKOV M N, et al. A comprehensive overview of exosomes as drug delivery vehicles - endogenous nanocarriers for targeted cancer therapy [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2014, 1846(1): 75-87.
- [29] SIMBARI F, MCCASKILL J, COAKLEY G, et al. Plasmalogen enrichment in exosomes secreted by a nematode parasite versus those derived from its mouse host: implications for exosome stability and biology [J]. *J Extracell Vesicles*, 2016, 5: 30741.
- [30] GIANOPOULOU L, LIANIDOU E S. Liquid biopsy in ovarian cancer [J]. *Adv Clin Chem*, 2020, 97: 13-71.
- [31] WANG G, WEN Y, FALETI O D, et al. A panel of exosome-derived miRNAs of cerebrospinal fluid for the diagnosis of moyamoya disease [J]. *Front Neurosci*, 2020, 14: 548278.
- [32] TAN S K, PASTORI C, PENAS C, et al. Serum long noncoding RNA HOTAIR as a novel diagnostic and prognostic biomarker in glioblastoma multiforme [J]. *Mol Cancer*, 2018, 17(1): 74.
- [33] ZHANG W, ZHOU X, ZHANG H, et al. Extracellular vesicles in diagnosis and therapy of kidney diseases [J]. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2016, 311(5): F844-F851.
- [34] ALIPOOR S D, MORTAZ E, GARSSEN J, et al. Exosomes and exosomal miRNA in respiratory diseases [J]. *Mediators Inflamm*, 2016, 2016: 5628404.
- [35] WEN D, PENG Y, LIU D, et al. Mesenchymal stem cell and derived exosome as small RNA carrier and Immunomodulator to improve islet transplantation [J]. *J Control Release*, 2016, 238: 166-175.
- [36] BARILE L, VASSALLI G. Exosomes: therapy delivery tools and biomarkers of diseases [J]. *Pharmacol Ther*, 2017, 174: 63-78.
- [37] YEO R W, LAI R C, ZHANG B, et al. Mesenchymal stem cell: an efficient mass producer of exosomes for drug delivery [J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2013, 65(3): 336-341.
- [38] LOU G, SONG X, YANG F, et al. Exosomes derived from miR-122-modified adipose tissue-derived MSCs increase chemosensitivity of hepatocellular carcinoma [J]. *J Hematol Oncol*, 2015, 8: 122.
- [39] 季康寿, 张哲, 侯平, 等. 从“浊气归心”论治冠心病及与外泌体的关系 [J]. *辽宁中医杂志*, 2019, 46(7): 1416-1418.
- [40] KLEIN J D, WANG X H. Electrically stimulated acupuncture increases renal blood flow through exosome-carried miR-181 [J]. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2018, 315(6): F1542-F1549.
- [41] ZHANG J, ZHANG H D, YAO Y F, et al. β -Elemene reverses chemoresistance of breast cancer cells by reducing resistance transmission via exosomes [J]. *Cell Physiol Biochem*, 2015, 36(6): 2274-2286.
- [42] AQIL F, KAUSAR H, AGRAWAL A K, et al. Exosomal formulation enhances therapeutic response of celastrol against lung cancer [J]. *Exp Mol Pathol*, 2016, 101(1): 12-21.
- [43] PANARO M A, CORRADO A, BENAMEUR T, et al. The emerging role of curcumin in the modulation of TLR-4 signaling pathway: focus on neuroprotective and anti-rheumatic properties [J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(7): 2299.
- [44] GUO C J, HE J L, SONG X M T, et al. Pharmacological properties and derivatives of shikonin - a review in recent years [J]. *Pharmacol Res*, 2019, 149: 104463.
- [45] YANG C H, MERLIN D. Lipid-based drug delivery nanoplatforms for colorectal cancer therapy [J]. *Nanomaterials (Basel)*, 2020, 10(7): 1424.
- [46] 周晋, 刘惠, 肖美凤, 等. 基于超分子“印迹模板”的中药成药性及制剂修饰研究策略 [J]. *中草药*, 2018, 49(18): 4205-4211.
- [47] 贺福元, 周逸群, 邓凯文, 等. 超分子化学对中医药理论的特殊影响 [J]. *中国中药杂志*, 2014, 39(8): 1534-1543.
- [48] 贺福元, 贺红, 邓凯文, 等. 超分子“印迹模板”(药素)特征的中药药理学研究方法探索 [J]. *中国中药杂志*, 2015, 40(21): 4313-4318.
- [49] BENIAS P C, WELLS R G, SACKKEY A B, et al. Structure and distribution of an unrecognized interstitium in human tissues [J]. *Sci Rep*, 2018, 8(1): 4947.
- [50] 谢浩然. 人体经络的实质研究 [J]. *中国针灸*, 2000, 20(10): 27-29.
- [51] ZHU L, SUN H T, WANG S, et al. Isolation and characterization of exosomes for cancer research [J]. *J Hematol Oncol*, 2020, 13(1): 152.
- [52] 贺福元, 邓凯文, 杨岩涛, 等. 基于超分子化学的中药药性理论研究方法探讨(1) 中药归经 [J]. *中国中药杂志*, 2015, 40(8): 1624-1629.
- [53] 宋晓晶, 张维波, 贾术永, 等. 应用小动物活体激光共聚焦成像系统对大鼠腹壁循经组织组织液分布的初

- 步观察[J]. 中国中医基础医学杂志, 2020, 26(4): 474-478.
- [54] J MELDOLESI . Exosomes and ectosomes in intercellular communication [J]. *Curr Biol*, 2018, 28(8):R435-R444.
- [55] 樊启猛,杨岩涛,肖美凤,等. 基于分子对接技术的补阳还五汤成分与缺血性脑卒中靶点的相互作用研究[J]. 中草药, 2019, 50(17):4200-4208.
- [56] 李海英,樊启猛,贺玉婷,等. 金银花、山银花动态挥发性成分的质量控制[J]. 中国实验方剂学杂志, 2020, 26(22): 148-155.
- [57] 曾荣华,欧阳厚淦,周露,等. 经络与淋巴系统关系的研究概况[J]. 中国中医基础医学杂志, 2018, 24(8): 1181-1183.
- [58] 邓凯文,贺福元. 中药归经研究的现状及“穴药”法的提出[J]. 中国中药杂志, 2013, 38(10): 1643-1648.
- [59] 李海英,贺鹏,贺玉婷,等. 中药复方配伍研究的关键问题及超分子化学解决对策[J]. 中草药, 2019, 50(12):2757-2762.
- [60] 廖琼,杨岩涛,刘志刚,等. 从茜草素的超分子印迹作用探讨中药归经体外研究方法[J]. 中草药, 2015, 46(22):3364-3369.
- [61] 李文姣,刘文龙,杨岩涛,等. 基于超分子“印迹模板”特征的中药制剂体系可调配性研究[J]. 中草药, 2018, 49(24):5733-5739.
- [62] SUN D, ZHUANG X, ZHANG S, et al. Exosomes are endogenous nanoparticles that can deliver biological information between cells [J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2013, 65(3):342-347.
- [63] NING B, WU H Q, ZHANG G L, et al. Immature dendritic cell exosomes suppress experimental autoimmune myasthenia gravis [J]. *J Neuroimmunol*, 2015, 285:71-75.
- [64] CONLAN R S, PISANO S, OLIVEIRA M I, et al. Exosomes as reconfigurable therapeutic systems [J]. *Trends Mol Med*, 2017, 23(7):636-650.
- [65] 王敏存,胡超,贺玉婷,等. 基于超分子“气析”理论构建中药制剂靶向性评价方法及实验验证[J]. 中国实验方剂学杂志, 2021, 27(20):113-120.
- [66] 李海英,潘雪,王敏存,等. 基于超分子“气析”理论定量整合与验证中药成分及靶点群[J]. 中国实验方剂学杂志, 2021, 27(21):207-213.

[责任编辑 刘德文]