

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2019.24.002  
文章编号: 1005-8982 (2019) 24-0008-07

## 番茄外泌体的分离提取工艺优化及其作为 药物载体的可行性分析\*

吴菊萍, 肖倩, 王建国, 王莺

(南方医科大学基础医学院 肿瘤研究所, 广东 广州 510515)

**摘要:** **目的** 优化番茄外泌体提取工艺, 初步探索番茄外泌体作为纳米载体的可行性。**方法** 利用蔗糖密度梯度法提取番茄外泌体; 动态光散射仪和透射电镜鉴定外泌体纳米粒子特征; 用MTT法检测外泌体对A549、A2780及HONE1(EBV+)3种肿瘤细胞的毒性。构建外泌体携带模型药物DiI和目的基因反义EBV-miR-BART7-3p的纳米药物, 考察其细胞摄取能力, 实时荧光定量聚合酶链反应检测基因药物的沉默效果。**结果** 优化工艺可获得具有纳米粒径的高收率外泌体(1.31 g/kg), 呈球形脂质双分子层结构, 并对细胞无毒性。外泌体构建的纳米药物可被细胞摄取并分布于胞浆。外泌体负载基因可有效降低目的基因的表达水平( $P < 0.05$ )。**结论** 多步差速离心法和蔗糖密度梯度法可优化番茄外泌体的提取工艺, 番茄外泌体可作为优良药物载体。

**关键词:** 番茄; 外泌体; 药物载体

**中图分类号:** R733

**文献标识码:** A

## Optimization of tomato-derived exosomes isolation and analysis of feasibility of it as nano carriers\*

Ju-ping Wu, Qian Xiao, Jian-guo Wang, Ying Wang

(Cancer Research Institute, School of Basic Medical Science, Southern Medical University,  
Guangzhou, Guangdong 510515, China)

**Abstract: Objective** To optimize extraction process of tomato-derived exosomes and preliminarily exploration of the feasibility of tomato-derived exosomes as nano carriers. **Methods** Tomato-derived exosomes were isolated by sucrose density gradient method. Dynamic light scattering and transmission electron microscopy were used to identify the characteristics of exosomes, and MTT assay was used to detect the toxicity of exosomes in A549, A2780 and HONE1 (EBV+) cells. Tomato-derived exosomes were used to deliver model drug DiI and antisense EBV-miR-BART7-3p to prepare nanomedicines. Their cellular uptake ability was tested in three cancer cells and the silence effect of nano gene drugs was investigated by the fluorescent quantitative PCR. **Results** Exosomes with high yield (1.31 g/kg) were obtained by the optimized procedure. Tomato-derived exosomes exhibited nano-size and showed the spherical lipid bilayer structure, and they had no significant cytotoxicity. The nanomedicine based on exosomes could be internalized in cells and distributed in the cytoplasm. The targeted gene expression level could be effectively silenced by gene drug, and the difference was statistically significant ( $P < 0.05$ ). **Conclusion** The extraction procedure of tomato-derived exosomes was optimized, and the feasibility of exosomes as excellent drug carriers was verified.

**Keywords:** tomatoes; exosomes; drug carriers

收稿日期: 2019-06-20

\* 基金项目: 2014年广州市科技攻关项目(No: 2014J4100149); 2015年南方医科大学创新驱动项目(No: CX2015N004)

[通信作者] 王莺, E-mail: ningmengquan@gmail.com; Tel: 020-62789438

外泌体是一种可参与细胞间信号传导的细胞外囊泡<sup>[1-3]</sup>, 具有脂质双分子层结构, 可作为药物载体应用于疾病研究<sup>[4]</sup>。目前研究多集中于动物细胞来源的外泌体<sup>[5]</sup>。然而其提取工艺复杂, 成本高, 收率低; 同时含有与供体细胞一致的脂质、核酸及蛋白等<sup>[6]</sup>, 应用过程存在安全性问题<sup>[7]</sup>。相比较植物来源的外泌体, 其生物相容性和安全性更为可靠<sup>[8-9]</sup>。本研究从番茄中提取外泌体, 对提取工艺进行摸索和优化, 旨在开发植物来源的外泌体作为药物载体。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

市售番茄, MTT、OptiPrep 购于美国 Sigma 公司, DiI 荧光染液购于上海碧云天生物公司, BCA 蛋白含量检测试剂盒购于江苏南京凯基生物, FAM 标记及未标记反义 EBV-miR-BART7-3p 由上海吉玛制药公司合成, DOTAP : DOPE (阳离子脂质体) 购于美国 Avanti 公司, miRNA 逆转录试剂盒购于大连宝生生物技术有限公司, 实时荧光定量聚合酶链反应试剂盒和探针购于日本 TaKaRa 公司, 动态光散射仪购于英国马尔文公司, Avanti J-26XP 低温高速离心机购于美国 BECKMAN 公司, Hitachi CP100WX 低温超高速离心机购于日本日立公司, TOPCONDS 150 透射电镜、正置荧光显微镜购于日本尼康公司, 电穿孔仪购于美国 BIO-RAD 公司, Agilent Technologies Mx3005P 荧光定量聚合酶链反应仪购于美国安捷伦科技有限公司。

### 1.2 方法

**1.2.1 细胞培养** 人肺腺癌 A549 细胞、人鼻咽癌 HONE1 (EBV+) 细胞用含 10% 胎牛血清 RPMI 1640 培养基, 人卵巢癌 A2780 细胞用含 10% 胎牛血清 DMEM 培养基, 常规置于 37°C、含 5% 二氧化碳 CO<sub>2</sub> 饱和湿度的培养箱中培养<sup>[10]</sup>。A549、A2780 细胞来源于南方医科大学基础医学院肿瘤研究所, HONE1 (EBV+) 细胞来源于香港大学。

**1.2.2 外泌体提取分离工艺及其优化** 番茄人工去皮, 榨取的新鲜番茄汁放入低温高速离心机, 4 000 r/min 离心 20 min, 去除大的残渣; 9 000 r/min 离心 1 h, 去除细小植物碎片, 留存上清。上清 11 000 r/min 离心 1.5 h, 收集沉淀, 并用磷酸盐缓冲液 (phosphate buffer saline, PBS) 重悬。应用蔗糖密度梯度离心法继续分离纯化<sup>[11]</sup>。配制 8%、30%、45% 及 60% 质量分数的蔗糖溶液, 在离心管中依次加入不同浓度蔗糖溶液, 最后缓慢加入重悬液于 8% 蔗糖溶液<sup>[12-14]</sup>。

36 000 r/min 离心 1.5 h, 合并收取上 2 层条带并加水稀释, 再进行离心除掉蔗糖, 用 PBS 重悬沉淀。鉴于第一步粗提过程外泌体损耗较多, 对工艺适当优化: 番茄汁 25 000 r/min 离心 1 h, 收集沉淀, 用 PBS 重悬; 浓缩后应用相同工艺, 进行蔗糖密度梯度离心, 收集目的条带, 冻干称重。

**1.2.3 外泌体纯化及表征** 应用薄膜水化法进一步提取外泌体脂质成分, 具体步骤: 涡旋混匀外泌体, 加入体积比为 2 : 1 的甲醇-氯仿混合液, 混匀后加入等量氯仿混匀, 最后加入与氯仿等体积去离子水后混匀, 于 4 000 r/min 离心 10 min 分为有机相和水相, 收集有机相、悬干, 形成脂质薄膜; 加入适量去离子水, 浸泡过夜, 超声水浴 10 min, 即得到脂质纯化后外泌体<sup>[15-17]</sup>。采用 BCA 蛋白含量检测试剂盒测定外泌体蛋白浓度进行定量。应用动态光散射 (dynamic light scattering, DLS) 仪和透射电子显微镜 (transmission electron microscope, TEM) 检测薄膜水化法前后外泌体的粒径、电位及形貌等。

**1.2.4 外泌体 MTT 细胞毒性实验** 应用蛋白含量检测试剂盒测定外泌体蛋白浓度并对其进行定量, 分别用不同浓度的外泌体作用于 A549、A2780 及 HONE1 (EBV+) 细胞 24 h, 检测其细胞毒性作用。将细胞按 2 000 个 / 孔铺于 96 孔板, 待细胞贴壁后加入浓度分别为 1、2、3 及 4 μg/ml 的外泌体, 共培养 24 h 后, 加入 20 μl 四甲基偶氮唑盐 5 mg/ml, 37°C 孵育 4 h, 加入 150 μl 二甲基亚砜, 混匀后, 酶标仪测定 490 nm 处各孔光密度 (optical density, OD) 值, 计算不同浓度条件下细胞活度值, 绘制抑制曲线。

**1.2.5 外泌体负载模型药物和目的基因** 在 2 μg/ml 外泌体氯仿溶液中加入适量 DiI 模型药物, 混匀后旋干, 加入去离子水, 浸泡过夜, 超声水浴 10 min, 即形成负载模型药物 DiI 的外泌体。薄膜水化法纯化 2 μg/ml 外泌体, 形成脂质薄膜层后, 加入电转液浸泡过夜, 超声水浴, 加 FAM 标记的或无标记的反义 EBV-miR-BART7-3p<sup>[18-19]</sup> (10 μl, 20 μmol/L), 在 400 V、125 μF 条件下进行电穿孔, 于冰上孵育 30 min, 形成负载 FAM 标记反义 EBV-miR-BART7-3p 的纳米基因药物<sup>[20-27]</sup>。应用紫外分光光度法, 分别建立 DiI 在 549 nm 和 FAM 标记的反义 EBV-miR-BART7-3p 在 490 nm 处的浓度-吸光度值标准曲线, 测定相应的 OD 值确定外泌体负载模型药物和目的基因浓度, 经检测纳米药

物分别含有 0.2 μg/ml DiI 和 0.1 μmol/L 目的基因。

**1.2.6 纳米药物的细胞摄取实验** 以游离 DiI 为对照, 将负载 DiI 的纳米药物分别与 A549 和 A2780 细胞共孵育 4 h; 按照其说明书制备 DOTAP : DOPE 脂质液, 按质量比 1 : 10 DNA 和脂质体配比, 加入与 10 μl (20 μmol/L) 目的基因相应的脂质体量, 混匀后制备 DOTAP : DOPE 携带目的基因药物, 将负载 FAM 标记的反义 EBV-miR-BART7-3p 纳米基因药物与 HONE1 (EBV+) 共孵育 4 h, 4% 多聚甲醛分别固定细胞, Hoechst 33342 染核, 在荧光显微镜下观察不同细胞对纳米药物的摄取情况。

**1.2.7 基因沉默实验** 取对数生长期 HONE1 (EBV+) 细胞接种于 6 孔板中, 待细胞贴壁, 分别由外泌体和 DOTAP : DOPE 负载反义 EBV-miR-BART7-3p 瞬时转染细胞, PBS 洗细胞 3 次后, 分别加入不同基因药物与 Opt-mem 培养基, 混匀, 转染 48 h 后裂解细胞, 提取总 RNA, 用探针法荧光定量聚合酶链式反应检测不同载体组基因沉默效果。

**1.3 统计学方法**

数据分析采用 SPSS 20.0 统计软件。计量资料以均数 ± 标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示, 比较用单因素方差分析, 进一步两两比较用 LSD-t 检验,  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

**2 结果**

**2.1 番茄外泌体性能表征**

蔗糖密度梯度离心后有 3 层条带, 合并收集上层和中层产物, 冻干后称重, 得番茄外泌体为 1.31 g/kg。DLS 仪测定结果表明, 纯化前外泌体平均粒径经薄膜水化法纯化后, 粒径变小。TEM 结果表明, 外泌体呈典型的圆形或椭圆形杯状脂质双分子层结构, 且纯化后粒子形状更加均一。见表 1 和图 1 ~ 3。

表 1 外泌体纯化前后性能表征 ( $\bar{x} \pm s$ )

时间	粒径 /nm	分散系数	电位 /mV
纯化前	153.447 ± 3.456	0.347 ± 0.051	0.052 ± 0.033
纯化后	130.893 ± 0.737	0.375 ± 0.004	-0.307 ± 0.346

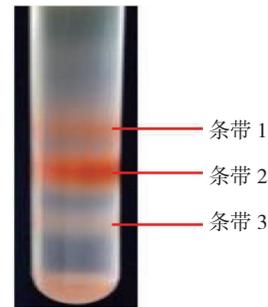


图 1 蔗糖密度梯度法分离后外泌体条带

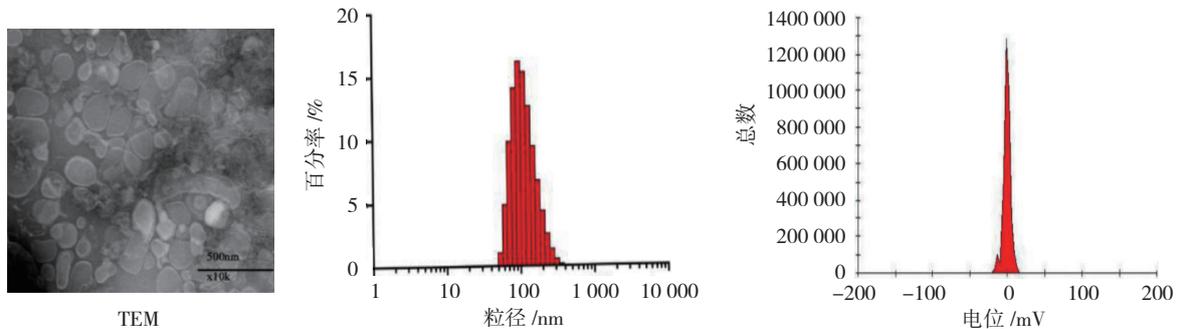


图 2 纯化前外泌体性能表征

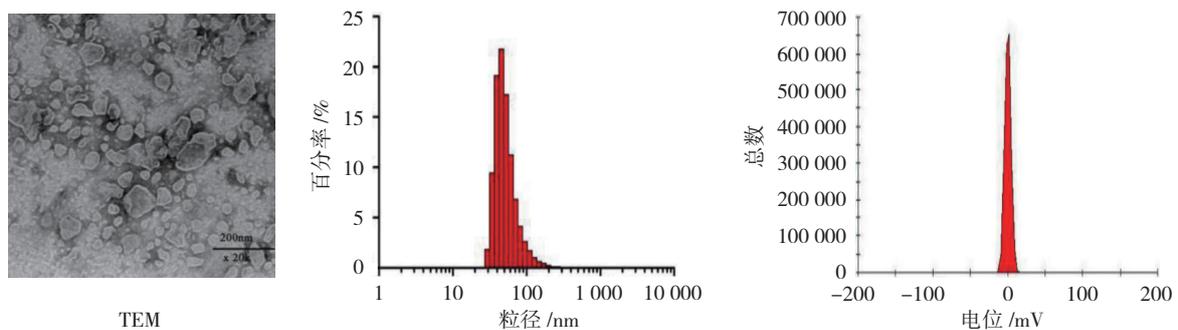
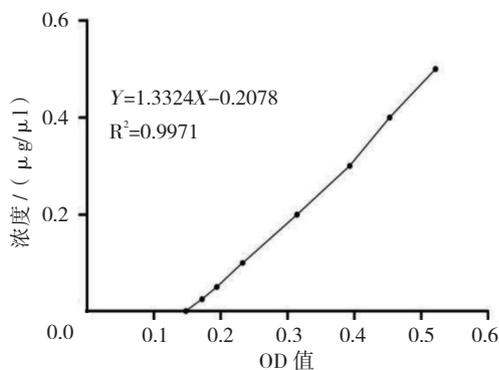


图 3 纯化后外泌体性能表征

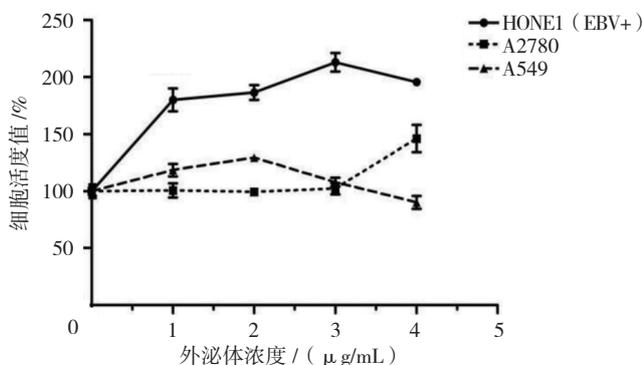
## 2.2 细胞毒性

MTT 法结果表明, 细胞存活率  $\geq 100\%$ 。说明外泌体未表现出细胞毒性, 外泌体具有良好的生物相容性。见图 4。



## 2.3 细胞对纳米药物的摄取

以外泌体为载体分别包裹脂溶性模型药物 DiI 和 FAM 标记的反义 EBV-miR-BART7-3p, 用游离 DiI 和 DOTAP : DOPE 负载的目的基因作为对照组, 考



A: BCA 蛋白定量标准曲线; B: 外泌体作用 HONE1 (EBV+)、A2780 及 A549 细胞 24 h 后的抑制效果。

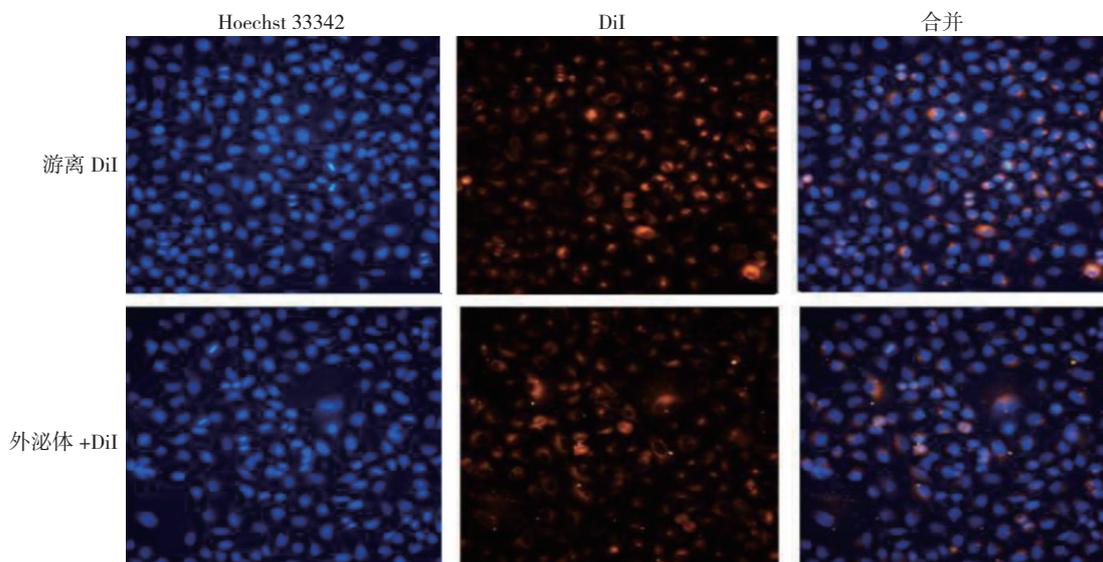
图 4 BCA 定量标准曲线与外泌体细胞毒性实验

察其进入细胞的情况。外泌体携带模型药物 DiI 在 A549 细胞和 A2780 细胞的摄取情况表明, 与游离 DiI 相比, 外泌体能成功携带模型药物进入细胞。与 DOTAP : DOPE 比较, 外泌体携带的目的基因效果更好, 说明外泌体是一种合适的基因载体, 且无论是携带模型药物还是目的基因, 所制备的纳米药物均分布在细胞的胞浆。见图 5。

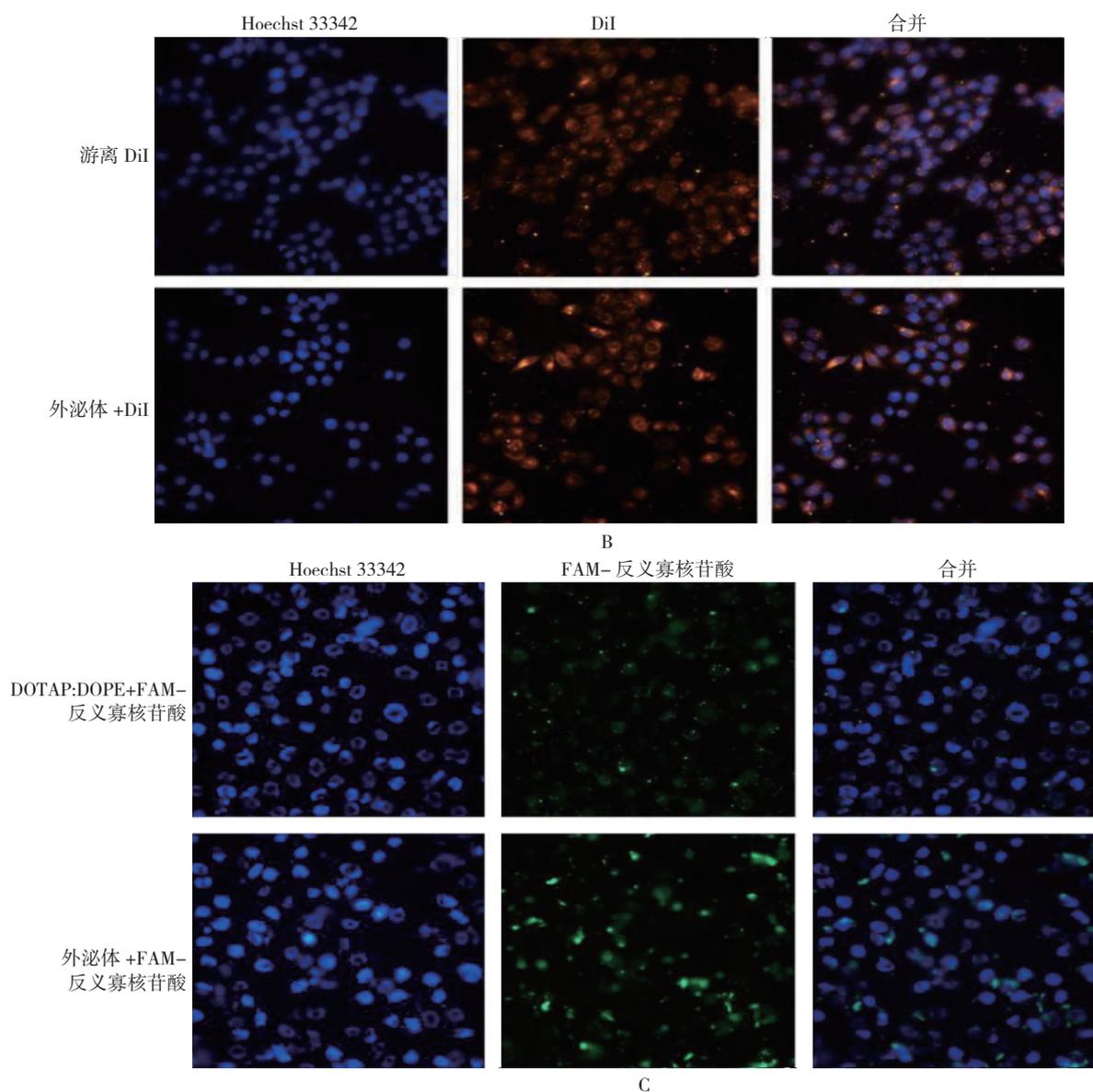
## 2.4 基因沉默实验

应用阳离子脂质体 DOTAP : DOPE 包裹目的基因作为对照, 考察外泌体携带目的基因的基因沉默效果。基因沉默结果显示, 各组目的基因相对表达量以正常对照组结果为 1, DOTAP : DOPE 组与外泌体组的基因相对表达量分别为  $(0.643 \pm 0.110)$  和

$(0.343 \pm 0.062)$ 。3 组目的基因相对表达量比较, 经单因素方差分析, 差异有统计学意义 ( $F=179.100, P=0.000$ ), 进一步两两比较经 LSD-t 检验, DOTAP : DOPE 组与正常对照组比较, 差异有统计学意义 ( $t=7.837, P=0.000$ ); DOTAP : DOPE 组低于正常对照组。外泌体组与正常对照组比较, 差异有统计学意义 ( $t=20.430, P=0.000$ ); 外泌体组低于正常对照组。外泌体组与 DOTAP : DOPE 组比较, 差异有统计学意义 ( $t=7.631, P=0.000$ ), 外泌体组低于 DOTAP : DOPE 组。相对于正常对照组, 外泌体组和阳离子脂质体组均能较好地沉默 EBV-miR-BART7-3p, 且外泌体组瞬转效率好于 DOTAP : DOPE 组。可见, 番茄外泌体可经过电穿孔方法成功将基因导入细胞中, 并影响其目的基因的表达。见图 6。



A



A: 外泌体携带模型药物 DiI 对 A549 细胞的摄取; B: 外泌体携带模型药物 DiI 对 A2780 细胞的摄取; C: 外泌体携带 FAM 标记的目的基因对 HONE1 (EBV+) 细胞的摄取。

图 5 细胞对模型药物和基因药物的摄取 (×40)

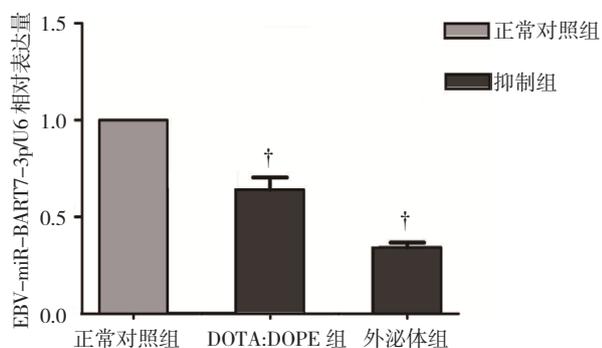


图 6 3 组目的基因相对表达量比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

### 3 讨论

常用的合成类纳米载体,如纳米球、纳米囊、脂质体及胶束等因其具备小尺寸效应、表面效应,在体内能进行长效循环、可连接特异靶向分子等优势,已广泛用于各种药物的实验性或临床性递送。虽然这些合成类纳米载体有较好的效果,但因对组织机体存在安全性低、生物相容性差及需要大规模合成等缺陷,限制其临床应用前景。因此,目前亟待开发更具安全性、良好生物相容性的新型纳米载体。

外泌体可作为细胞间载体, 携带生物分子在细胞间相互传递、交流信息等; 另外, 纳米尺寸的外泌体也可作为载体携带药物应用于各种疾病的研究, 具有广阔的应用潜力。本研究从天然可食用植物番茄中提取外泌体, 对提取工艺进行摸索和优化, 旨在开发植物来源外泌体作为纳米级药物载体应用于各类疾病的治疗。

现有的外泌体分离方法主要包括多步差速离心、蔗糖密度梯度离心、试剂盒沉淀及免疫磁珠分选等。其中, 试剂外泌体表面由类似于细胞膜的脂质双分子层组成, 具有一定的疏水性, 因此用外泌体提取试剂盒捆绑水分子, 通过常规离心方法收集沉淀获取外泌体。这种快速提取外泌体的方法虽然简便快捷、样本需求少及对设备要求低, 但其分离的沉淀成分复杂, 可能掺杂一些未知的疏水大分子物质, 获得的外泌体纯度并不高。相比较应用多步差速离心和蔗糖密度梯度离心提取外泌体, 成本更加低廉且可增加收率, 特别是两者结合的方法能进一步提高外泌体纯度。本文应用多步差速离心和蔗糖密度梯度离心法从食用植物番茄提取外泌体并进一步优化工艺, 减少粗提过程中外泌体的损耗, 从而提高收率至 1.31 g/kg。

本研究得到的外泌体相比较传统纳米载体系统, 生物相容性好、利用度高且安全无毒, 并能成功携带模型药物和目的基因进一步应用于各种疾病的药物递送系统研究。笔者初步进行以外泌体为载体携带模型药物和目的基因, 制备纳米药物, 并考察不同细胞对以外泌体为载体的纳米药物摄取情况的研究, 结果显示不同细胞对所制备的纳米药物均有良好的摄取能力, 说明外泌体作为药物载体可行。

综上所述, 相比较模型药物, 外泌体携带目的基因进入细胞的能力更好, 更加适宜作为基因载体, 且以外泌体为载体的基因沉默效果优于常用阳离子脂质体 DOTAP : DOPE。本研究仅开展体外细胞水平的考察, 仍需体内实验进一步验证。

#### 参 考 文 献:

- [1] EL-ANDALOUSSI S, LAKHAL S, MÄGER I, et al. Exosomes for targeted siRNA delivery across biological barriers[J]. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2013, 65(3): 391-397.
- [2] SHERIDAN C. Exosome cancer diagnostic reaches market[J]. *Nature Biotechnology*, 2016, 34(4): 359-360.
- [3] IRACI N, LEONARDI T, GESSLER F, et al. Focus on extracellular vesicles: physiological role and signalling properties of extracellular membrane vesicles[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2016, 17(2): 1422-1467.
- [4] ZHANG P, ZHANG L, QIN Z, et al. Genetically engineered liposome-like nanovesicles as active targeted transport platform[J]. *Advanced Materials*, 2018, DOI: 10.1002/adma.201705350.
- [5] HOSHINO A, COSTA-SILVA B, SHEN T, et al. Tumour exosome integrins determine organotropic metastasis[J]. *Nature*, 2015, 527(7578): 329-335.
- [6] ZABOROWSKI M P, BALAJ L, BREAKEFIELD X O, et al. Extracellular vesicles: composition, biological relevance, and methods of study[J]. *BioScience*, 2015, 65(8): 783-797.
- [7] 元洪昭. 红细胞外泌体为载体靶向肿瘤药物投递研究[D]. 天津: 天津大学, 2012: 4-7.
- [8] WANG Q, ZHUANG X, MU J, et al. Delivery of therapeutic agents by nanoparticles made of grapefruit-derived lipids[J]. *Nature Communications*, 2013, DOI: 10.1038/ncomms2886.
- [9] YANG C, ZHANG M, MERLIN D. Advances in plant-derived edible nanoparticle-based lipid nano-drug delivery systems as therapeutic nanomedicines[J]. *Journal of Materials Chemistry*, 2018, 6(9): 1312-1321.
- [10] LI L, LI C, WANG S, et al. Exosomes derived from hypoxic oral squamous cell carcinoma cells deliver miR-21 to normoxic cells to elicit a prometastatic phenotype[J]. *Cancer Research*, 2016, 76(7): 1770-1780.
- [11] WANG B, ZHUANG X, 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.
- [12] 李秋文, 萨仁高娃, 李宏涛, 等. 蔗糖密度梯度离心联合超滤技术分离恶性胸腹水来源的 exosomes[J]. *感染、炎症、修复*, 2008(4): 221-222.
- [13] 韦莉, 刘爵, 张杰, 等. 用蔗糖密度梯度离心法提纯禽脑脊髓炎病毒[J]. *北京农业科学*, 1999, 17(6): 35-36.
- [14] 张年辉. 优化的蔗糖密度梯度离心法分离完整叶绿体[J]. *实验技术与管理*, 2010(7): 44-46.
- [15] SUN D, ZHUANG X, XIANG X, et al. A novel nanoparticle drug delivery system: The anti-inflammatory activity of curcumin is enhanced when encapsulated in exosomes[J]. *Molecular Therapy*, 2010, 18(9): 1606-1614.
- [16] ZHUANG X, XIANG X, GRIZZLE W, et al. Treatment of brain inflammatory diseases by delivering exosome encapsulated anti-inflammatory drugs from the nasal region to the brain[J]. *Molecular Therapy*, 2011, 19(10): 1769-1779.
- [17] JU S, MU J, 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.
- [18] CAI L M, LYU X M, LUO W R, et al. EBV-miR-BART7-3p promotes the EMT and metastasis of nasopharyngeal carcinoma cells by suppressing the tumor suppressor PTEN[J]. *Oncogene*, 2015, 34(17): 2156-2166.
- [19] CAI L M, LI J B, ZHANG X N, et al. Gold nano-particles (AuNPs) carrying anti-EBV-miR-BART7-3p inhibit growth of EBV-

- positive nasopharyngeal carcinoma[J]. *Oncotarget*, 2015, 6(10): 7838-7850.
- [20] GRECO K A, FRANZEN C A, FOREMAN K E, et al. PLK-1 silencing in bladder cancer by siRNA delivered with exosomes[J]. *Urology*, 2016, 91: 241-247.
- [21] LAMICHHANE T N, RAIKER R S, JAY S M. Exogenous DNA loading into extracellular vesicles via electroporation is size-dependent and enables limited gene delivery[J]. *Molecular Pharmaceutics*, 2015, 12(10): 3650-3657.
- [22] WAHLGREN J, KARLSON T D L, BRISLERT M, et al. Plasma exosomes can deliver exogenous short interfering RNA to monocytes and lymphocytes[J]. *Nucleic Acids Research*, 2012, DOI: 10.1093/nar/gks463.
- [23] KOOIJMANS S A A, STREMERSCHE S, BRAECKMANS K, et al. Electroporation-induced siRNA precipitation obscures the efficiency of siRNA loading into extracellular vesicles[J]. *Journal of Controlled Release*, 2013, 172(1): 229-238.
- [24] WAHLGREN J, STATELLO L, SKOGBERG G, et al. Delivery of small interfering RNAs to cells via exosomes[J]. *Methods in Molecular Biology*(Clifton, N.J.), 2016, 1364: 105-125.
- [25] MUNAGALA R, AQIL F, JEYABALAN J, et al. Bovine milk-derived exosomes for drug delivery[J]. *Cancer Letters*, 2016, 371(1): 48-61.
- [26] MOMEN-HERAVI F, BALA S, BUKONG T, et al. Exosome-mediated delivery of functionally active miRNA-155 inhibitor to macrophages[J]. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, 2014, 10(7): 1517-1527.
- [27] EL-ANDALOUSSI S, LEE Y, LAKHAL-LITTLETON S, et al. Exosome-mediated delivery of siRNA in vitro and in vivo[J]. *Nature Protocol*, 2012, 7(12): 2112-2126.

(唐勇 编辑)