

植物细胞外囊泡研究进展

赵淑举[#] 黄佳欣[#] 李师鹏 蒋苏*

(齐鲁师范学院生命科学学院, 济南 250200)

摘要 细胞外囊泡(extracellular vesicles, EVs)是一类具有脂质膜包被的囊泡, 其内包裹着蛋白质、脂质、RNA等活性大分子, 由细胞分泌到质外体, 对细胞间的交流至关重要。哺乳动物研究显示EVs广泛参与了细胞间通讯、肿瘤的发生和转移、免疫应答等多种生理过程。与之相比, 植物EVs的研究相对滞后, 近年来研究发现EVs在植物发育、抗病、植物与微生物共生等方面发挥重要作用。该文对真核生物EVs的研究进行了总结, 着重梳理了植物EVs的发生、功能鉴定和分泌机制等方面的进展, 并对植物EVs研究的关键问题和应用前景进行了展望。

关键词 植物; 细胞外囊泡; 外泌体; 多囊泡体; EXPO

Research Progress and Perspectives of Extracellular Vesicles in Plants

ZHAO Shuju[#], HUANG Jiaxin[#], LI Shipeng, JIANG Su*

(School of Life Sciences, Qilu Normal University, Jinan 250200, China)

Abstract EVs (extracellular vesicles) are membrane-bound vesicles released by cells into the extracellular space, facilitating the transfer of proteins, lipids, nucleic acids, and metabolites between cells. Consequently, they have emerged as crucial mediators of intercellular communication. The fundamental roles of EVs have been extensively studied in a wide range of physiological and pathological contexts in mammals, including intercellular signaling, tumorigenesis and metastasis, and immune responses. Despite the extensive research on EVs in mammals, plant EVs have not been thoroughly investigated. However, it has become increasingly clear that plant EVs fulfill various cellular functions in development, plant defense, and symbiosis. This article provides an overview of recent advances in plant EVs research and compares them with findings in mammals. Specifically, it focuses on the functional characteristics of plant EVs and the molecular mechanisms underlying their secretion. Additionally, this review discusses the future directions and prospects of plant EVs research.

Keywords plants; EVs (extracellular vesicles); exosome; MVBs (multivesicular bodies); EXPO (exocyst positive organelle)

细胞外囊泡(extracellular vesicles, EVs)的研究可追溯到1946年CHARGAFF和WEST^[1]的工作, 他们在离心实验中发现血浆中存在一类血小板相关颗粒, 此类颗粒后期被WOLF^[2]命名为“血小板尘粒(platelet dust)”; 1965年JENSEN^[3]通过透射电镜

在棉花助细胞外观察到颗粒状“单膜球体(single-membraned spheres)”, 开启了植物EVs研究的大门; 几乎同时, 在革兰氏阴性菌中也报道了类似的球形小“颗粒”结构, KNOX等^[4]将其描述为“细胞外球体(extracellular globules)”, 表明EVs在生物界是广泛存

收稿日期: 2024-01-10

接受日期: 2024-03-18

山东省自然科学基金(批准号: ZR2020MC067)资助的课题

[#]共同第一作者

*通信作者。Tel: 0531-66778095, E-mail: jiangsu@qlnu.edu.cn

Received: January 10, 2024

Accepted: March 18, 2024

This work was supported by the Shandong Natural Science Foundation (Grant No.ZR2020MC067)

[#]These authors contributed equally to this work

*Corresponding author. Tel: +86-531-66778095, E-mail: jiangsu@qlnu.edu.cn

在的结构。对EVs发生的探究始于植物学家HALPERIN和JENSEN^[5]的工作,他们利用透射电镜首次观察到了胡萝卜细胞中多囊泡体(multivesicular bodies, MVBs)与细胞质膜(plasma membrane, PM)发生融合释放出EVs的过程,类似结果也在红细胞分化过程的电镜观察研究中得到了验证^[6],说明EVs发生与MVBs密切相关。1996年RAPOSO等^[7]将这类由细胞分泌到细胞外的囊泡命名为外泌体(exosome),并证明了B淋巴细胞产生的外泌体具有抗原呈递能力,说明外泌体在动物免疫反应中发挥重要作用^[8]。2007年VALADI等^[9]首次报道了外泌体含有mRNA和microRNAs,这一发现显示EVs可能是细胞间通信的重要结构;近期研究发现植物EVs可以携带sRNA进行跨界转移,干扰真菌致病基因的表达,参与植物抗病^[10];四跨膜蛋白TET8(TETRASPANIN 8)突变后,tet8突变体分泌的EVs减少,对病原菌的易感性增强^[11-12]。上述开创性的发现大大激发了人们对EVs的研究热情。此外,随着近年来人们对药用植物来源EVs生物活性的研究,将其研发为药物制剂或载体成为一个新的应用热点^[13-16]。

随着生化、细胞、蛋白质组学和分子生物学技术的发展及其在EVs研究领域的应用,越来越多的证据表明,植物EVs在植物发育、抗病、植物与微生物共生等方面发挥重要作用^[17-18]。本文将重点综述植物EVs的发生、生物学功能和分泌机制等方面的研究进展,并对植物EVs研究领域的关键问题进行梳理,最后对EVs研究的应用前景进行展望,以期对相关研究提供参考。

1 植物EVs发生的途径

已有研究显示EVs是一群高度异质化的囊泡^[19]。迄今为止,哺乳动物EVs被发现主要有三种来源:(1) MVBs与PM融合释放;(2) 从PM直接向外出芽形成的微囊泡(microvesicles, MVs);(3) 细胞死亡过程中产生的凋亡小体(apoptotic bodies, ABs)^[20]。迄今为止,已知植物EVs是直接或间接来源于MVBs、EXPO(exocyst-positive organelle)、小液泡(small vacuoles)等细胞内部结构^[21],然而关于植物EVs是否来源于MVs和ABs尚未见报道。

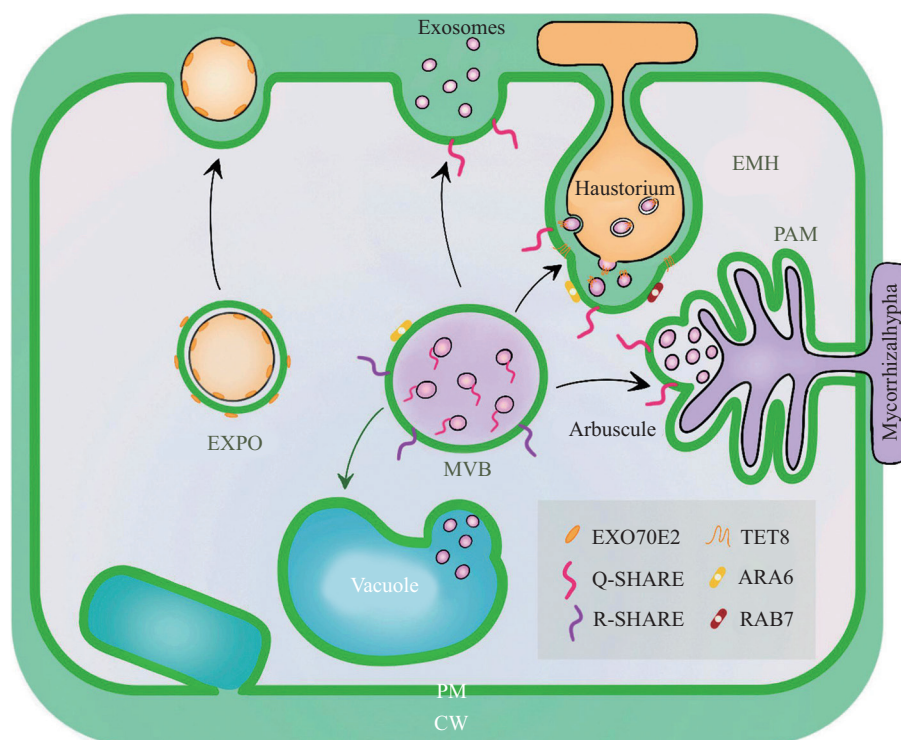
1.1 MVBs途径

MVBs是一类晚期内体(late endosomes),也称液泡前结构(prevacuolar compartment, PVC),其直径在

200~1 000 nm之间,其腔内包含多个微小囊泡(intralumenal vesicles, ILVs),直径为30~100 nm^[22]。MVBs的去向有两个:一是与液泡或溶酶体融合,介导货物分子在胞内降解或循环利用^[23];二是与PM融合导致其内容物(包括ILVs)释放到细胞外环境,释放的囊泡被称为外泌体^[24](图1)。MVBs介导的EVs发生途径最早报道于植物,JENSEN^[3]于1965年首次通过透射电镜在棉花助细胞外观察到EVs,并将其描述为与多囊泡体有关的“单膜球体(single-membraned spheres)”。两年后,HALPERIN和JENSEN^[5]利用胡萝卜细胞培养研究体系首次报道了植物外泌体源于MVBs与PM的融合过程。后期,在植物对生物胁迫的响应中也发现了此过程,研究发现白粉菌(*Blumeria graminis* f.sp.*hordei*)侵染大麦叶片时,含有抗菌化学成分的囊泡在叶片被真菌侵染部位发生聚集,进一步电镜观察显示此处MVBs外膜与PM融合,释放ILVs到细胞外,这一过程类似于动物的外泌体分泌^[25]。最近的研究发现,MVBs来源的EVs也参与了植物与微生物共生关系的建立,在丛枝菌根的形成和成熟过程中,观察到MVBs与宿主细胞形成的丛枝周膜(periarbuscular membrane, PAM)融合,导致EVs被释放到植物和真菌发生相互作用的丛枝间隙(periarbuscular space, PAS)中^[26]。由此可见,植物细胞MVBs来源的EVs参与了多种重要的生物学过程(图1)。

1.2 EXPO途径

植物外泌体产生的另一种来源是EXPO,该结构由姜里文实验室^[27-28]首次报道。EXO70是组成胞泌复合体(exocyst complex)的一个关键亚基,前期酵母、动物和植物研究显示,胞泌复合体介导了高尔基后囊泡与PM的拴系过程^[29]。拟南芥EXO70家族有23个成员,推测不同成员参与了不同生物学过程的调控^[30],譬如近期发现,胞泌复合体除了参与胞吐外,还参与了植物细胞自噬过程^[31]。EXO70E2是拟南芥EXO70家族的一个成员,WANG等^[28]利用活体细胞观察到荧光蛋白标记的EXO70E2在PM附近和胞质中呈点状分布,有趣的是EXO70E2-GFP的信号不与任何已知的经典运输途径标记物共定位,该未知结构被命名为EXPO。免疫电镜观察发现EXO70E2抗体标记了一类双层膜包被的结构,该类结构与质膜发生融合,并将单层膜囊泡释放到细胞外。类EXPO结构也在动物细胞中被观察到,说明此



黑色箭头显示分泌途径; 绿色箭头示胞内降解途径; 实线表示已确认途径; 虚线表示需确认途径。PM: 细胞质膜; CW: 细胞壁; PAM: 丛枝周膜; EHM: 吸器外质膜; MVBs: 多囊泡体; EXPO: 胞泌复合体相关结构。

Black arrows show secretory pathways; green arrows show intracellular degradation pathways; solid lines show identified pathways, while dashed lines show pathways which need to be identified. PM: plasma membrane; CW: cell wall; PAM: periarbuscular membrane; EHM: extra-haustorial membrane; MVBs: multivesicular bodies; EXPO: exocyst positive organelle.

图1 植物EVs发生途径

Fig.1 Pathways of plant EVs generation

类结构具有广泛的生物学意义^[27]。鉴于EXPO具有双层膜结构, 与自噬体类似, 进一步研究发现, 自噬体标记物ATG8和EXO70E2在正常生理条件下标记了不同的亚细胞结构; 然而, 在自噬诱导的条件下, ATG8和EXO70E2在液泡内共定位, 说明EXPO可通过自噬途径降解^[32](图1)。目前, 虽然对EXPO的功能还不了解, 但可以肯定的是其参与了EVs的发生, 并代表了一种进化保守的机制。

1.3 其他途径

除了MVBs和EXPO外, 液泡也可能参与EVs的形成。这一推测基于以下两个证据: 一是在特定条件下, 液泡膜可与PM发生融合, 譬如拟南芥叶片受丁香假单胞杆菌(*Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000)侵染后, 叶表皮细胞液泡膜与PM发生融合, 导致液泡内容物(包括各种蛋白酶类)释放到细胞外^[33]。二是MVBs可与液泡发生融合, 并将腔内囊泡释放到液泡中, 当此类液泡与PM融合时, 源于MVBs的ILVs将被释放到细胞外。因此, 推测一部分EVs可能来源

于液泡^[34](图1)。当然, 这一推测需要进一步验证, 因为目前尚未直接观察到液泡与PM融合释放出EVs的过程, 液泡中的ILVs有可能在释放到胞外前已经发生了降解。

在毕赤酵母(*Pichia Pastoris*)和哺乳动物中, 发现自噬体与MVBs融合形成自噬内涵体(amphisomes), 随后自噬内涵体与PM融合释放外泌体^[35]。因此, 推测植物自噬体可能是外泌体形成的另一个途径。但是迄今为止, 这一途径在植物中尚未见报道, 它们在外泌体发生过程中是否发挥作用尚需明确^[36]。

综上, 已有研究表明, 植物EVs主要通过MVBs、EXPO与PM的融合释放到细胞外空间; 另外, MVBs/EXPO与液泡和自噬体的融合可能也参与了EVs的发生。

2 植物EVs的生物学功能

EVs的异质性除了表现在来源的多元化外, 还体现在功能的多样性。人们起初认为EVs分泌仅为

细胞排泄废物所需要, 譬如在网织红细胞成熟为红细胞的过程中, 转铁蛋白受体通过 EVs 排出细胞被弃用^[6,20]。现发现 EVs 具有非常广泛的生物学功能^[37], 特别是近年来, 相关研究成果呈现“爆炸性”增长。目前, 哺乳动物 EVs 的研究比较系统, 因此对其功能的了解也比较全面, 涉及到免疫应答、神经系统发育、癌症发生等生理和病理过程^[38]。

虽然已在多种植物样本中分离和观察到 EVs 结构, 但关于植物 EVs 的功能研究相对较少。前期有报道从橄榄 (*Olea europaea*) 花粉体外萌发的培养基中分离到 EVs 类似结构, 推测其与受精有关^[39], 此外尚未见其他相关报道, 因此 EVs 在植物生长发育调控过程中的功能尚需进一步研究。当前研究聚焦且比较明确的 EVs 生物学功能是在植物-微生物互动中发挥着关键作用^[40-41]。

2.1 EVs与植物抗病反应

EVs 参与植物抗病反应是基于对 EVs 成分的分析。在番茄 (*Solanum lycopersicum*) 中, 通过高速离心从番茄细胞培养基中获得含有 EVs 的脂蛋白组分, 利用质谱分析法 (mass spectrometry, MS) 进行成分分析, 鉴定出多种参与防御反应的蛋白质, 如木葡聚糖特异性内切酶 (xyloglucan-specific endoglucanase) 抑制因子、天冬氨酸蛋白酶 (aspartyl protease)、多聚半乳糖醛酸酶 (polygalacturonase) 抑制蛋白、果胶乙酰酯酶 (pectinacetyl esterase)、过氧化物酶 (peroxidase)、类渗调蛋白 (osmotin-like protein) 等, 这表明 EVs 很可能与番茄防御反应有关^[42]。与之类似, 人们在拟南芥叶片质外体来源的 EVs 中也检测到多种应激蛋白质和 sRNA 的富集^[40]。另外, 从向日葵 (*Helianthus annuus*) 幼苗的细胞外液中也成功分离出 EVs, 成分分析显示其内含有细胞壁重塑酶和防御蛋白^[43], 当用纯化的 EVs 处理植物病原真菌 (*Sclerotinia sclerotiorum*) 时, 会导致真菌孢子生长被抑制和细胞死亡^[44]。对多种植物进行的研究显示, EVs 普遍含有各种防御相关的蛋白质、sRNA 和脂质信号, 并且发现病原体感染可以诱导植物 EVs 的分泌, 表明其在植物防御中发挥作用^[40]。有研究显示拟南芥 EVs 对特定的 miRNA 和 siRNA 有选择性富集, 在已鉴定的 sRNA 中, 发现一类功能未知的“微小 RNA”(10~7 nt) 高度富集在 EVs 中^[45]。当被真菌病原体 (*Botrytis cinerea*) 感染时, 拟南芥细胞通过分泌 EVs 样囊泡将 sRNA 递送到病原体入侵部位的质外体, 真菌细胞通过未知

机制吸纳这些含有 sRNA 的囊泡, 导致其致病性关键基因沉默^[9]。这些发现表明 EVs 介导的生物跨界交流是植物抗病的重要机制。

EXO70E2 是 EXPO 结构的标志物^[28], 拟南芥研究发现该基因突变导致 flg22 (衍生于细菌鞭毛蛋白的小肽) 诱导的胼胝质分泌被抑制, 表明 EXO70E2 参与了植物抗病反应^[46]。在这一过程中 EXO70E2 是否经过 EXPO 途径尚需确定。

EVs 参与植物抗病细胞学机制的探究也取得了长足进展。用白粉病菌 (*Golovinomyces orontii*) 感染拟南芥时, 植物会在病菌吸器形成的部位发生细胞壁加厚, 以抑制吸器生长, 并阻止其对植物细胞营养的掠夺, 在这一过程中发现 PEN1 (PENETRATION1)/SYP121 和 ABC 转运蛋白 PEN3 (PENETRATION3) 通过 EVs 转运到病原体侵染部位的质外体, 因此推测 EVs 与抗菌物质的分泌有关^[47]。大麦 (*Hordeum vulgare*) 被大麦白粉菌 (*Blumeria graminis*) 感染时, EVs 状结构在真菌吸器周围富集, 这些结构不仅阻止真菌侵染, 而且还通过封闭胞间连丝抑制相邻细胞的超敏性细胞死亡^[25,48]。

2.2 EVs参与植物-微生物共生

许多植物与丛枝菌根真菌存在共生关系, 这种关系有利于植物获得土壤的矿质营养, 如磷酸盐和硝酸盐等; 作为交换, 宿主植物向真菌提供脂肪酸和糖等营养物质。这种共生关系依赖于真菌和宿主植物细胞之间特化结构的建立。真菌菌丝在根的皮肤细胞发育成丛枝状结构, 宿主细胞的 PM 随着真菌丛枝生长发生重塑, 形成丛枝周膜 (PAM); PAM、真菌 PM 以及两者之间的丛枝间隙 (PAS) 构成一个特化的宿主-微生物界面结构, 为营养物质和信号分子交换提供场所。根孢囊霉 (*Rhizophagus irregularis*) 定植于苜蓿根皮层细胞中, 利用电镜和断层扫描技术对宿主-微生物界面结构细节进行研究, 在 PAS 的基质中观察到许多小泡和管状结构, 这些结构被命名为基质内隔室 (intramatrix compartments, IMCs)。根据它们的外观, 可区分出两种类型: IMC-I 和 IMC-II。IMC-Is 呈囊泡和哑铃形结构, 有时还发现弯曲的管状结构; 而 IMC-IIs 都呈管状结构^[26]。在接种菌根真菌 *Rhizophagus irregularis* 和 *Gigaspora rosea* 的水稻 (*Oryza sativa*) 中也观察到类 IMCs 结构^[49]。以上研究结果说明 EVs 在共生生物之间的营养交换和信息交流过程中发挥重要作用, 但目前关于 EVs 在共生

物种之间协同交流的分子机制仍不清楚^[50]。

3 植物EVs的分泌调控

尽管EVs研究近年来受到人们的广泛关注,但是关于EVs细胞生物学的理解还比较局限,特别是对其分泌调控的分子机制知之甚少。已有文献报道,植物EVs的分泌是一个受到精细调控的过程^[21]。细胞对EVs分泌调控至少存在三个层面,包括货物装载(MVBs的生成)、转运和膜融合介导的释放过程。EVs在植物中的主要生物发生途径是通过MVBs,而MVBs的发生起始于内体,受到多种因子的调控^[50-51]。已有研究鉴定了多个调控MVBs发生的蛋白,据其效应蛋白和作用机制可划分为3大类:转运必需内吞体分选复合物(endosomal sorting complex required for transport, ESCRT)依赖的机制、特定脂质分子驱动的机制、四次跨膜家族蛋白驱动的机制^[52]。

ESCRT复合物促进MVBs的形成。ESCRT机制相关蛋白在脊椎动物中约有30种,组装成5个功能亚复合体,其中ESCRT-I/II/III调控ILV出芽,辅助Vps4复合体参与最终的芽泡脱落和ESCRT回收过程^[53]。植物含有ESCRT复合物亚基的全部同源物,许多研究显示ESCRT蛋白突变影响了MVBs的发生^[51],但其对EVs分泌的影响尚未见报道。ESCRT复合物在内体的募集是启动MVBs发生的关键步骤,其中磷脂酰肌醇-3-磷酸(PtdIns3P)是一种内体膜中含量丰富的磷酸肌醇,负责将ESCRT-0复合物募集到早期内体^[52]。

动物研究发现内体膜脂也参与了ILVs的发生,少突胶质细胞(oli-neu cells)内体膜鞘脂分子(sphingolipid ceramide)之间发生相互作用聚集形成脂筏,有助于内体膜弯曲向内出芽形成ILVs,这一途径不依赖于ESCRT机制^[54]。姜黄素(curcumi)是一种在姜黄(*Curcuma longa*)植物中发现的疏水性多酚,近期有研究报道其可通过增加细胞内鞘脂(神经酰胺)浓度促进外泌体分泌^[55]。另一篇报道发现动物细胞磷脂酰甘油-3-磷酸(PI3P)向磷脂酰肌醇-4-磷酸(PI4P)的转化介导了分泌型MVBs的发生^[56]。ESCRT依赖性和ESCRT非依赖性脂质介导的途径在许多生物过程中共存,然而,研究显示EVs发生的脂质途径可能具有细胞特异性,譬如在黑色素瘤细胞中发现外泌体的产生不受鞘脂浓度的影响^[57]。

此外,近年研究发现四次跨膜蛋白家族成员

CD63、CD9、CD82、CD81等参与调控分泌型MVBs和EVs的生成。根据该家族蛋白的结构特点和已有研究结果,研究者们提出“成簇”的假说:四次跨膜蛋白家族与许多蛋白质存在互作,并且该类蛋白质之间同样易形成多聚复合物,通过蛋白互作在内吞体膜上团聚成簇,形成所谓的“四次跨膜蛋白富集微结构域”,该结构域可以有选择地与货物蛋白结合,促进货物在内吞体膜上的分选和富集,进而有利于ILVs形成^[58]。

MVBs的运输受到Rab GTPase和SNARE等多种蛋白的调控。在哺乳动物中,Rab7蛋白参与外泌体的分泌^[58]。在植物细胞中,Rab7 GTPase(RabG3c)定位在晚期内体和液泡膜,介导了晚期内体向液泡的转运过程。在病原菌感染过程中,发现RabG3c被募集到吸器外质膜(extrahaustorial membrane, EHM),表明Rab7 GTPase参与了MVBs向宿主-病原互作界面结构的转运过程^[59]。然而,关于何种因素引发这一重定向事件以及其调控机制尚不了解。

SNARE蛋白是介导膜融合的关键因子,该家族蛋白含有保守的SNARE基序,根据该基序中一个高度保守氨基酸的不同,将该家族分为定位于靶膜的Q-SNARE蛋白(Qa、Qb、Qc)和运输囊泡上的R-SNARE蛋白,三个Q-SNARE蛋白和一个R-SNARE蛋白通过SNARE基序互作形成异源四聚体介导膜融合发生^[60]。已有研究显示,多种SNARE蛋白参与了病原菌诱导的EVs分泌过程。譬如,PEN1/SYP121是一种Qa-SNARE,拟南芥被病原菌侵染后,该蛋白被发现分泌到细胞外质体中^[40,47],推测这些SNARE蛋白是通过MVBs途径分泌出去的。

胞泌复合体介导了运输囊泡在靶膜的拴系,促进了SNARE复合体介导的膜融合过程^[29]。拟南芥胞泌复合体亚基EXO70E2定位于EXPO结构^[28],推测其参与了EXPO与膜的融合。利用荧光共振能量转移分析和双分子荧光互补发现,EXO70E2与胞泌复合体(exocyst complex)的另外两个亚基SEC6和SEC10发生直接互作,表明EXO70E2可作为胞泌复合体组分发挥作用^[27]。未来,需要对EXO70E2突变体进行更为精细的细胞学表型分析,以阐明胞泌复合体在EXPO分泌中的作用。

4 植物EVs研究的挑战与展望

综上,植物EVs在细胞之间交流以及植物与微

生物互作方面发挥重要作用;近期研究显示植物来源的EVs表现出较低的免疫原性,将其开发为肿瘤靶向药物载体,具有潜在的应用前景^[61],因此关于植物EVs研究越来越受到人们的关注。随着植物基因组信息的不断丰富、基因编辑技术的广泛应用、细胞成像技术的快速发展,特别是EVs分离纯化技术的不断成熟^[62-63],将大大促进植物EVs研究的快速发展。但植物EVs的研究仍然任重道远,许多重要问题亟待回答。

已有对EVs的理解主要源于动物细胞的研究。植物细胞与动物细胞相比具有细胞壁这一特化结构,推测植物存在特异的EVs发生和调控机制。植物细胞壁-细胞膜-细胞骨架组成一个复杂的联动体系(the cell wall-PM continuum),人们在探究PM和细胞骨架之间的互作方面已经取得了许多进展,但是关于细胞壁和PM之间的联动关系仍然知之甚少^[64]。由于细胞膨压,细胞壁和PM发生紧密接触^[65],细胞壁对质膜形成挤压力,这种机械力对质膜出芽形成EVs的过程产生阻碍,植物有何应对机制?细胞壁通过联动体系对EVs的发生、分泌和生物活性有何影响?这些问题的回答将帮助人们理解植物特异的EVs的生物学功能。

已知哺乳动物EVs的发生主要通过MVBs和微囊泡途径^[20],在植物细胞中已经确定了MVBs途径,但是否存在微囊泡途径尚未明确,其与MVBs和EXPO途径之间是怎样协同调控的?货物分子本身是否也参与ILVs的发生?另外,MVBs降解或分泌途径的选择是怎样控制的?最近动物细胞研究揭示,胞泌复合体在MVBs的募集是MVBs向胞外分泌的关键事件^[56],植物是否也存在类似机制?目前,关于植物胞泌复合体在EVs的发生和向膜转运机制方面知之甚少,譬如EXO70E2在EXPO生物发生和分泌中的确切功能是什么?EXPO途径在植物和动物细胞中都被确认^[27],但EXPO的生物学功能尚未明确,EXO70E2突变体细胞学表型的鉴定将有助于对该途径生物学意义的理解。

已有研究显示植物细胞含有不同的EVs亚群,表现在其发生途径不同、形态大小差异、转运物质不同等。目前已经鉴定了多个植物EVs亚群,譬如TET8/9(TETRASPANIN8/9)-阳性MVBs来源的EVs^[9]、PEN1-阳性EVs^[40,66]、EXPO来源的EVs^[28]以及花粉来源的EVs^[39]。然而,目前EVs亚群的分类仍缺乏科

学的标准。利用更加细化的遗传表型分析、精细的EVs分离分析技术,以及开发更加特异的细胞学标志物,建立一套系统明确的植物EVs分类标准,有利于对植物EVs发生、分泌和生物学功能等进行系统的研究,其结果将有助于理解植物EVs的生物学意义,并为其产业化应用奠定理论基础。

参考文献 (References)

- [1] CHARGAFF E, WEST R. The biological significance of the thromboplastic protein of blood [J]. *J Biol Chem*, 1946, 166(1): 189-97.
- [2] WOLF P. The nature and significance of platelet products in human plasma [J]. *Br J Haematol*, 1967, 13(3): 269-88.
- [3] JENSEN W A. The ultrastructure and histochemistry of the synergids of cotton [J]. *Am J Bot*, 1965, 52: 238-56.
- [4] KNOX K W, VESK M, WORK E. Relation between excreted lipopolysaccharide complexes and surface structures of a lysine-limited culture of *Escherichia coli* [J]. *J Bacteriol*, 1966, 92(4): 1206-17.
- [5] HALPERIN W, JENSEN W A. Ultrastructural changes during growth and embryogenesis in carrot cell cultures [J]. *J Ultrastruct Res*, 1967, 18(3): 428-43.
- [6] ORR L, ADAM M, JOHNSTONE R M. Externalization of membrane-bound activities during sheep reticulocyte maturation is temperature and ATP dependent [J]. *Biochem Cell Biol*, 1987, 65(12): 1080-90.
- [7] RAPOSO G, NIJMAN H W, STOORVOGEL W, et al. B lymphocytes secrete antigen-presenting vesicles [J]. *J Exp Med*, 1996, 183(3): 1161-72.
- [8] 陈旭, 周义正, 罗金柱, 等. 外泌体功能的相关研究进展[J]. *中国细胞生物学学报*(CHEN X, ZHOU Y Z, LUO J Z, et al. Advances in research on exosome function [J]. *Chinese Journal of Cell Biology*), 2018, 40(6): 1023-7.
- [9] VALADI H, EKSTROM K, BOSSIOS A, et al. Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells [J]. *Nat Cell Biol*, 2007, 9(6): 654-9.
- [10] CAI Q, QIAO L, WANG M, et al. Plants send small RNAs in extracellular vesicles to fungal pathogen to silence virulence genes [J]. *Science*, 2018, 360(6393): 1126-9.
- [11] LIU N J, WANG N, BAO J J, et al. Lipidomic analysis reveals the importance of gipcs in arabidopsis leaf extracellular vesicles [J]. *Mol Plant*, 2020, 13(10): 1523-32.
- [12] LIU N J, BAO J J, WANG L J, et al. Arabidopsis leaf extracellular vesicles in wound-induced jasmonate accumulation [J]. *Plant Signal Behav*, 2020, 15(12): 1833142.
- [13] NEMATI M, SINGH B, MIR R A, et al. Plant-derived extracellular vesicles: a novel nanomedicine approach with advantages and challenges [J]. *Cell Commun Signal*, 2022, 20(1): 69.
- [14] ALZHRANI F A, KHAN M I, KAMELI N, et al. Plant-derived extracellular vesicles and their exciting potential as the future of Next-generation drug delivery [J]. *Biomolecules*, 2023, 13(5): 839.
- [15] SHAO M, JIN X, CHEN S, et al. Plant-derived extracellular

- vesicles: a novel clinical anti-inflammatory drug carrier worthy of investigation [J]. *Biomed Pharmacother*, 2023, 169: 115904.
- [16] 苏勇汇, 徐珊珊, 王欢, 等. 药用植物细胞外囊泡作为新型药效物质的研究进展[J]. 中草药(SU Y H, XU S S, WANG H, et al. Research progress on extracellular vesicles of medicinal plants as novel pharmacodynamic substances [J]. *Chinese Herbal Medicine*), 2023, 54(12): 4044-52.
- [17] URZI O, RAIMONDO S, ALESSANDRO R. Extracellular vesicles from plants: current knowledge and open questions [J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(10): 5366.
- [18] CAI Q, HE B, WANG S, et al. Message in a bubble: shuttling small RNAs and proteins between cells and interacting organisms using extracellular vesicles [J]. *Annu Rev Plant Biol*, 2021, 72: 497-524.
- [19] HE B, HAMBY R, JIN H. Plant extracellular vesicles: Trojan horses of cross-kingdom warfare [J]. *FASEB Bioadv*, 2021, 3(9): 657-64.
- [20] 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): 213-28.
- [21] CUI Y, GAO J, HE Y, et al. Plant extracellular vesicles [J]. *Protoplasma*, 2020, 257(1): 3-12.
- [22] ALENQUER M, AMORIM M J. Exosome biogenesis, regulation, and function in viral infection [J]. *Viruses*, 2015, 7(9): 5066-83.
- [23] HANSON P I, CASHIKAR A. Multivesicular body morphogenesis [J]. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 2012, 28: 337-62.
- [24] MATHIEU M, MARTIN-JAULAR 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.
- [25] AN Q, HUCKELHOVEN R, KOGEL K H, et al. Multivesicular bodies participate in a cell wall-associated defence response in barley leaves attacked by the pathogenic powdery mildew fungus [J]. *Cell Microbiol*, 2006, 8(6): 1009-19.
- [26] LIMPENS E. Extracellular membranes in symbiosis [J]. *Nat Plants*, 2019, 5(2): 131-2.
- [27] DING Y, WANG J, CHUN L J, et al. Exo70E2 is essential for exocyst subunit recruitment and EXPO formation in both plants and animals [J]. *Mol Biol Cell*, 2014, 25(3): 412-26.
- [28] WANG J, DING Y, WANG J, et al. EXPO, an exocyst-positive organelle distinct from multivesicular endosomes and autophagosomes, mediates cytosol to cell wall exocytosis in Arabidopsis and tobacco cells [J]. *Plant Cell*, 2010, 22(12): 4009-30.
- [29] MEI K, GUO W. Exocytosis: a new exocyst movie [J]. *Curr Biol*, 2019, 29(1): R30-2.
- [30] LI S, VAN OS G M, REN S, et al. Expression and functional analyses of EXO70 genes in Arabidopsis implicate their roles in regulating cell type-specific exocytosis [J]. *Plant Physiol*, 2010, 154(4): 1819-30.
- [31] ZARSKY V. Exocyst functions in plants: secretion and autophagy [J]. *Febs Lett*, 2022, 596(17): 2324-34.
- [32] LIN Y, DING Y, WANG J, et al. Exocyst-positive organelles and autophagosomes are distinct organelles in plants [J]. *Plant Physiol*, 2015, 169(3): 1917-32.
- [33] HATSUGAI N, IWASAKI S, TAMURA K, et al. A novel membrane fusion-mediated plant immunity against bacterial pathogens [J]. *Genes Dev*, 2009, 23(21): 2496-506.
- [34] CUI Y, CAO W, HE Y, et al. A whole-cell electron tomography model of vacuole biogenesis in Arabidopsis root cells [J]. *Nat Plants*, 2019, 5(1): 95-105.
- [35] MANJITHAYA R, SUBRAMANI S. Role of autophagy in unconventional protein secretion [J]. *Autophagy*, 2010, 6(5): 650-1.
- [36] ZHUANG X, CHUNG K P, LUO M, et al. Autophagosome biogenesis and the endoplasmic reticulum: a plant perspective [J]. *Trends Plant Sci*, 2018, 23(8): 677-92.
- [37] YANEZ-MO M, SILJANDER P R, ANDREU Z, et al. Biological properties of extracellular vesicles and their physiological functions [J]. *J Extracell Vesicles*, 2015, 4: 27066.
- [38] IANNOTTA D, A A, KIJAS A W, et al. Entry and exit of extracellular vesicles to and from the blood circulation [J]. *Nat Nanotechnol*, 2024, 19(1): 13-20.
- [39] PRADO N, ALCHE J D, CASADO-VELA J, et al. Nanovesicles are secreted during pollen germination and pollen tube growth: a possible role in fertilization [J]. *Mol Plant*, 2014, 7(3): 573-7.
- [40] RUTTER B D, INNES R W. Extracellular vesicles isolated from the leaf apoplast carry stress-response proteins [J]. *Plant Physiol*, 2017, 173(1): 728-41.
- [41] RYBAK K, ROBATZEK S. Functions of extracellular vesicles in immunity and virulence [J]. *Plant Physiol*, 2019, 179(4): 1236-47.
- [42] GONORAZKY G, LAXALT A M, DEKKER H L, et al. Phosphatidylinositol 4-phosphate is associated to extracellular lipoproteic fractions and is detected in tomato apoplastic fluids [J]. *Plant Biol*, 2012, 14(1): 41-9.
- [43] CANAL L, PINEDO M. Extracellular vesicles: a missing component in plant cell wall remodeling [J]. *J Exp Bot*, 2018, 69(20): 4655-8.
- [44] REGENTE M, PINEDO M, SAN C H, et al. Plant extracellular vesicles are incorporated by a fungal pathogen and inhibit its growth [J]. *J Exp Bot*, 2017, 68(20): 5485-95.
- [45] BALDRICH P, RUTTER B D, KARIMI H Z, et al. Plant extracellular vesicles contain diverse small RNA species and are enriched in 10- to 17-nucleotide "Tiny" RNAs [J]. *Plant Cell*, 2019, 31(2): 315-24.
- [46] REDDITT T J, CHUNG E H, ZAND K H, et al. AvrRpm1 functions as an ADP-Ribosyl transferase to modify NOI-domain containing proteins, including arabidopsis and soybean RPM1-interacting protein 4 [J]. *Plant Cell*, 2019, 31(11): 2664-81.
- [47] MEYER D, PAJONK S, MICALI C, et al. Extracellular transport and integration of plant secretory proteins into pathogen-induced cell wall compartments [J]. *Plant J*, 2009, 57(6): 986-99.
- [48] AN Q, EHRLER R, KOGEL K H, et al. Multivesicular compartments proliferate in susceptible and resistant MLA12-barley leaves in response to infection by the biotrophic powdery mildew fungus [J]. *New Phytol*, 2006, 172(3): 563-76.
- [49] ROTH R, HILLMER S, FUNAYA C, et al. Arbuscular cell invasion coincides with extracellular vesicles and membrane tubules [J]. *Nat Plants*, 2019, 5(2): 204-11.
- [50] HOLLAND S, ROTH R. Extracellular vesicles in the arbuscular mycorrhizal symbiosis: current understanding and future perspectives [J]. *Mol Plant Microbe Interact*, 2023, 36(4): 235-44.
- [51] GAO C, ZHUANG X, SHEN J, et al. Plant ESCRT complexes: moving beyond endosomal sorting [J]. *Trends Plant Sci*, 2017,

- 22(11): 986-98.
- [52] TENG F, FUSSENEGGER M. Shedding light on extracellular vesicle biogenesis and bioengineering [J]. *Adv Sci*, 2020, 8(1): 2003505.
- [53] JUAN T, FURTHAUER M. Biogenesis and function of ESCRT-dependent extracellular vesicles [J]. *Semin Cell Dev Biol*, 2018, 74: 66-77.
- [54] TRAJKOVIC K, HSU C, CHIANTIA S, et al. Ceramide triggers budding of exosome vesicles into multivesicular endosomes [J]. *Science*, 2008, 319(5867): 1244-7.
- [55] GARCIA-SEISDEDOS D, BABIY B, LERMA M, et al. Curcumin stimulates exosome/microvesicle release in an *in vitro* model of intracellular lipid accumulation by increasing ceramide synthesis [J]. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Biol Lipids*, 2020, 1865(5): 158638.
- [56] LIU D A, TAO K, WU B, et al. A phosphoinositide switch mediates exocyst recruitment to multivesicular endosomes for exosome secretion [J]. *Nat Commun*, 2023, 14(1): 6883.
- [57] GURUNG S, PEROCHAU D, TOURAMANIDOU L, et al. The exosome journey: from biogenesis to uptake and intracellular signalling [J]. *Cell Commun Signal*, 2021, 19(1): 47.
- [58] HESSVIK N P, LLORENTE A. Current knowledge on exosome biogenesis and release [J]. *Cell Mol Life Sci*, 2018, 75(2): 193-208.
- [59] BOZKURT T O, BELHAJ K, DAGDAS Y F, et al. Rerouting of plant late endocytic trafficking toward a pathogen interface [J]. *Traffic*, 2015, 16(2): 204-26.
- [60] 冯瑶洁, 蒋苏, 刘振东, 等. 植物R-SNARE蛋白研究进展[J]. 中国细胞生物学学报(FENG Y J, JIANG S, LIU Z D, et al. Advances in the research of R-SNARE in plants [J]). *Chinese Journal of Cell Biology*, 2023, 45(5): 786-94.
- [61] ZHOU X, JIA Y, MAO C, et al. Small extracellular vesicles: non-negligible vesicles in tumor progression, diagnosis, and therapy [J]. *Cancer Lett*, 2024, 580: 216481.
- [62] CHEN A, HE B, JIN H. Isolation of extracellular vesicles from arabidopsis [J]. *Curr Protoc*, 2022, 2(1): e352.
- [63] YUGAY Y, TSYDENESHIEVA Z, RUSAPETOVA T, et al. Isolation and characterization of extracellular vesicles from arabidopsis thaliana cell culture and investigation of the specificities of their biogenesis [J]. *Plants*, 2023, 12(20): 3604.
- [64] LIU Z, PERSSON S, SANCHEZ-RODRIGUEZ C. At the border: the plasma membrane-cell wall continuum [J]. *J Exp Bot*, 2015, 66(6): 1553-63.
- [65] PROSEUS T E, BOYER J S. Turgor pressure moves polysaccharides into growing cell walls of *Chara corallina* [J]. *Ann Bot*, 2005, 95(6): 967-79.
- [66] ZHANG J, QIU Y, XU K. Characterization of GFP-AtPEN1 as a marker protein for extracellular vesicles isolated from *Nicotiana benthamiana* leaves [J]. *Plant Signal Behav*, 2020, 15(9): 1791519.