



## 工程化外泌体在肿瘤靶向治疗中的应用\*

宋佳璐<sup>1)</sup> 金意欣<sup>1)</sup> 牟星宇<sup>1)</sup> 蒋宇寰<sup>1)</sup> 王 婧<sup>1,2)\*\*</sup><sup>1)</sup> 四川大学华西口腔医学院, 口腔疾病防治全国重点实验室, 国家口腔医学中心, 国家口腔疾病临床医学研究中心, 成都 610041;<sup>2)</sup> 四川大学华西口腔医院种植科, 成都 610041)

**摘要** 肿瘤是全球第二位死亡因素, 其发病机制的复杂性对人类健康构成了严重威胁。外泌体通过运送蛋白质、核酸等物质参与细胞通讯, 调节肿瘤微环境, 影响肿瘤的增殖和进展。凭借天然生物相容性和独特的生理特性, 外泌体可作为药物载体装载多种抗肿瘤药物, 跨越生物屏障, 逃避免疫清除, 靶向运输药物至肿瘤组织处, 为肿瘤治疗提供新的策略。本文系统地总结了外泌体的分离和载药技术, 探讨了改善外泌体载药系统靶向性、留存率和渗透率的方法, 并阐述了外泌体作为载药体系装载不同抗肿瘤药物的应用现状。具体来说, 外泌体能够装载抗癌药物来降低药物的不良反应并提高到达肿瘤组织的药物浓度, 装载蛋白质改善药物利用度, 装载 siRNA、miRNA 以调节基因表达、抑制肿瘤的增殖和侵袭。此外, 外泌体还可以作为肿瘤标志物用于疾病的早期诊断。尽管外泌体作为载药体系展现出强大的应用潜力, 但在标准化和规模化生产方面仍面临诸多挑战。本文对工程化外泌体在肿瘤靶向治疗中的未来发展方向进行展望, 提出植物来源外泌体的应用潜能和外泌体与人工智能相结合的发展方向。

**关键词** 工程化外泌体, 肿瘤, 靶向治疗

中图分类号 R730.5 DOI: 10.16476/j.pibb.2024.0430

CSTR: 12369.14.pibb.20240430

肿瘤是仅次于心血管疾病的全球第二位死亡因素<sup>[1]</sup>。近年来的研究表明, 外泌体参与调节肿瘤微环境, 影响肿瘤的增殖和进展, 因此其已逐渐成为探索新的肿瘤治疗方法的焦点<sup>[2]</sup>。

细胞外囊泡 (extracellular vesicle, EV) 是由细胞分泌而来的一种膜封闭颗粒, 根据产生途径不同分为微泡、凋亡小体和外泌体3类。其中微泡直接从质膜出芽而来, 粒径在 100~1 000 nm 之间, 凋亡小体在细胞凋亡过程中细胞破裂形成, 外泌体是多泡体与质膜融合后从细胞中释放而来, 粒径在 40~160 nm 之间<sup>[3-4]</sup>。外泌体继承了原细胞的生理特性, 具有良好的生物相容性, 能够跨越多种生理屏障, 且因不具有复制或分化潜能而不存在肿瘤形成的潜在风险<sup>[5]</sup>。外泌体的表面膜蛋白具有识别和免疫逃逸等生物学功能, 也能够保护它们免受吞噬和补体介导的裂解, 因此外泌体能够将各类分子例如蛋白质、核酸等运送到特定部位来调节细胞通信<sup>[6]</sup>。外泌体已成为新兴的生物标志物和新靶点药物传递系统, 为肿瘤治疗提供新的思路。

本文综述了工程化外泌体装载药物在肿瘤治疗中的研究进展, 按其实际应用, 从装载各类具有抗肿瘤作用的物质、作为肿瘤检测的指标两方面进行阐述。除此之外, 本文整理了提高工程化外泌体对肿瘤治疗效果的方法, 基于目前检索到的研究, 提出了该领域目前的局限性并给出临床应用的展望。

## 1 外泌体的载药过程

### 1.1 分离

将外泌体从起始样本中分离需要考虑: 起始样本中的内容物, 所需外泌体的产量和纯度等。同时需要综合经济因素、操作人员等情况来选择合适的分离方法。目前仍然没有方法能够同时实现外泌体分离的高产量、高纯度和良好的生物活性<sup>[7]</sup>。可

\* 四川省自然科学基金 (2024NSFSC1598) 和四川大学华西口腔医学院资助临床研究项目 (LCYJ-ZD-202303) 资助。

\*\* 通讯联系人。

Tel: 15927209322, E-mail: wj18334721002@163.com

收稿日期: 2024-10-10, 接受日期: 2025-03-04

分离得到最高产量外泌体的方法为超滤，其次为尺寸排阻色谱法（size-exclusion chromatography, SEC）、超速离心；可获得最高纯度的外泌体分离方法为超速离心，其次为 SEC、超滤<sup>[8]</sup>（图1，表1）。

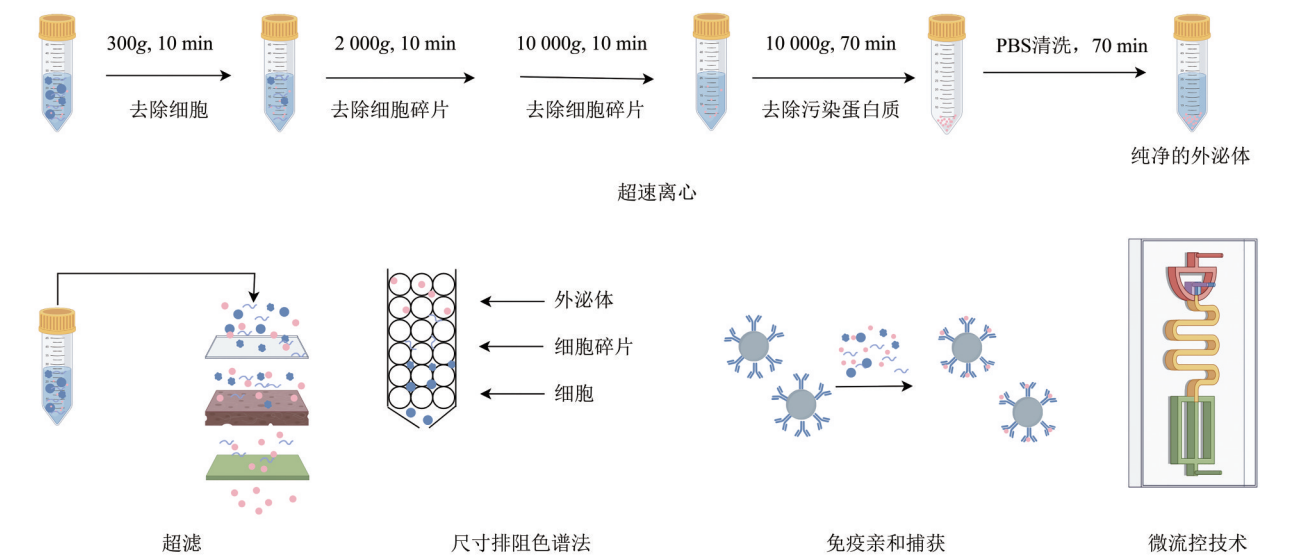


Fig. 1 Advantages and disadvantages of methods for exosome isolation  
图1 外泌体的分离方法

Table 1 Methods of exosome isolation  
表1 外泌体分离方法的优缺点

| 分离方法    |          | 优点                      | 缺点                | 参考文献    |
|---------|----------|-------------------------|-------------------|---------|
| 超速离心    | 差速超速离心   | 最常用的分离方法                | 损害外泌体结构，产量低       | [9]     |
|         | 密度梯度超速离心 | 提高外泌体纯度                 | 不能通过表面标志物分离外泌体    | [10]    |
|         | 超滤       | 操作简单，价格低廉               | 增加的剪切力可能造成外泌体结构损伤 | [11]    |
| 尺寸排阻色谱法 |          | 产量大                     | 纯度低               | [12]    |
| 免疫亲和和捕获 |          | 保存外泌体活性，纯度高，分离的外泌体具有特异性 | 耗时长，价格昂贵，容量低，产量低  | [13]    |
| 微流控技术   |          | 纯度高                     | 价格昂贵，操作困难，产量低     | [14-15] |

1.1.1 超速离心

超速离心作为外泌体分离的金标准，主要包括差速超速离心和密度梯度离心两种方法。差速超速离心交替使用高速和低速来分离不同质量的物质，不同转速交替使用的过程中需要不断去除上清液和转移样品，使得外泌体的产量下降，重复超速离心也会损害外泌体结构。密度梯度超速离心使用特定离心力将颗粒分配到特定梯度上。相对差速超速离心来说，密度梯度离心提高了外泌体纯度，但产物仍会被脂蛋白等污染<sup>[10]</sup>。总体来说，超速离心技术耗时长，仪器昂贵，且在两种方法中高离心力都可能损伤外泌体结构。

1.1.2 超滤和尺寸排阻色谱法（SEC）

超滤是使用不同相对分子质量孔径的超滤膜进

行外泌体分离。SEC利用不同物质在凝胶孔中的洗脱速度不同进行外泌体分离。大分子不能进入凝胶孔，从间隙中流动快速洗脱；小分子进入凝胶孔中洗脱速度较慢。超滤和SEC都具有操作简单、价格低廉、不影响外泌体生物活性的优点。但产物也可能被与外泌体尺寸相当的纳米颗粒污染。超滤时颗粒在超滤膜上聚集造成膜堵塞不仅会缩短膜的使用寿命，还会降低分离速率和产量<sup>[16]</sup>。超滤时加压形成的剪切力会造成外泌体损伤。SEC则不受剪切力影响，产物中外泌体的结构相对完整。

1.1.3 免疫亲和和捕获

免疫亲和和捕获基于外泌体表面的特异生物标记物，利用相应的特异抗体来分离，这种方法分离纯度高<sup>[13]</sup>。与超速离心相比，获得的外泌体的生物

活性更高。外泌体表面具有多种四跨肽：CD9、CD63、CD81等，常作为外泌体的生物标志物。但其他亚群的囊泡表面也可能表达与外泌体相同的生物标志物。例如，能在较大的囊泡表面观察到CD9，也能在密度大于外泌体的囊泡表面发现CD63<sup>[7]</sup>。免疫亲和捕获存在耗时长、价格昂贵、容量低、产量低的缺点，并且仅适用于无细胞样品。

超速离心、SEC、超滤、免疫亲和捕获作为传统的分离方法，没有一种分离策略能够同时实现高产量和高纯度，可通过结合多种分离方法来实现效益最大化<sup>[17]</sup>。SEC和免疫亲和捕获的方法相结合，表现出比单一方法更高的捕获效率和高纯度。超速离心与SEC相结合，不仅能够增大样本处理量，还能够降低污染物的干扰，从而实现高产量和低耗时<sup>[18]</sup>。超滤和SEC结合能够在低耗时的前提下实现高纯度、高产量，并且保证了各种功能的完整性<sup>[19]</sup>。

1.1.4 微流控技术

微流控技术是通过微小管道处理微小流量液体的系统，在外泌体的分离中，根据原理不同进一步将其分类。一类为基于外泌体物理特性进行分离的微流控。纳米微流控芯片利用声学场和流体动力学场分离尺寸不同，密度不同的外泌体<sup>[20]</sup>。集成了

纳米多孔膜的微流控芯片利用传统超滤的原理在短时间内实现更高产量，更小的外泌体结构损伤<sup>[14]</sup>。另一类为基于免疫亲和性的微流控芯片，与免疫亲和捕获的原理相同，通过在芯片上增加抗体修饰的磁珠提高反应面积。研究将适配体CD63和适配体蛋白酪氨酸激酶7固定于微流控芯片上，实现了10<sup>10</sup>~10<sup>11</sup>/L的高捕获率<sup>[15]</sup>。但微流控芯片存在制作复杂、价格昂贵、操作困难、产量低的缺点。

1.2 载药

外泌体的载药方式可分为外源性负载和内源性负载（表2）。外源性负载是指将药物分子载入已形成的外泌体中，包括主动装载和被动装载。主动装载是通过物理或化学方式破坏外泌体膜后将药物装载入外泌体中，包括：电穿孔、超声处理、挤压和冻融法（图2a），这类方法在装载药物的同时会改变外泌体物理、化学及形态特征。电穿孔是指在外泌体表面引入电场脉冲形成微小的孔隙将药物分子转运到外泌体内部。电穿孔相对于简单孵育，具有定量、可控和可重复性，广泛应用于siRNA、miRNA等亲水小分子的装载中，但溶液中的电荷容易导致装载物沉淀，装载效率降低。电穿孔时电压等条件控制不当也可能造成外泌体的结构受损<sup>[21]</sup>。超声孵育是通过超声震荡使得外泌体膜出现空泡，药物进入。超声孵育装载siRNA时形成

Table 2 Advantages and disadvantages of methods for exosome drug loading  
表2 外泌体载药方法的优缺点

| 载药方式        | 优点                              | 缺点                             | 参考文献    |
|-------------|---------------------------------|--------------------------------|---------|
| 外源性负载——电穿孔  | 定量、可控和可重复性                      | 电荷易导致装载物沉淀；电压控制不当可能造成          | [21-23] |
| 主动装载        |                                 | 外泌体结构损伤                        |         |
| 超声处理        | 外泌体聚集现象比电穿孔少，且外泌体细胞摄取率较高        | 超声可能破坏外泌体的结构；不同条件分离的外泌体大小、结构不同 | [24]    |
| 挤压          | 操作简单                            | 存在外泌体破裂的风险                     | [25]    |
| 冻融法         | 效果稳定                            | 装载效率低于超声孵育；改变囊泡稳定性，降低细胞摄取率     | [26]    |
| 外源性负载——简单孵育 | 化学结构相对稳定                        | 装载效率低、药物释放速率不可控                | [27-28] |
| 被动装载        |                                 |                                |         |
| 内源性负载——直接转染 | 高度可控，通过基因编辑技术控制内容物              | 操作复杂                           | [25]    |
| 共孵育         | 与亲本细胞有同样的表面抗体和膜结构，可通过表面抗体识别靶向细胞 | 产量低                            | [25]    |

的聚集体比电穿孔少12倍，且外泌体细胞摄取率较高，可能是由于超声处理后外泌体疏水部分暴露，与靶细胞细胞膜相互作用增强<sup>[24]</sup>。挤压法是指将带药的溶液与外泌体混合，再通过脂质挤出机

获得负载药物的外泌体。挤压法操作简单，但受限于外泌体对容积和压力的敏感性，可能导致部分外泌体破裂。冻融法是将药物和外泌体混合后，反复进行冷冻干燥、解冻的循环，使得外泌体膜反复破

裂和修复。冻融法虽然效果稳定但会影响外泌体的细胞摄取率<sup>[26]</sup>。目前应用最广泛的主动装载法为电穿孔。被动装载是利用药物浓度梯度或药物与外泌体之间的疏水作用, 将药物装载到外泌体中, 例如简单孵育。简单孵育适用于化学结构相对稳定的药物分子, 但存在装载效率低、药物释放速率不可控等缺点。研究采用简单孵育装载5-氟尿嘧啶的装载率仅为4.9%, 对多柔比星的装载率仅为13%<sup>[27-28]</sup>。

内源性负载方法包括直接转染、共孵育(图2b)。直接转染是通过基因工程, 将编码目标药物的miRNA导入到细胞中表达, 从而使细胞能够产生携带特定药物的外泌体<sup>[29]</sup>。此方法也可以结合化学诱导和生物活性物质刺激等技术手段, 增加细胞分泌的外泌体数量。共孵育是将含有药物的细胞培养液与产生外泌体的细胞共同培养, 再从细胞中分离已经装载药物的外泌体<sup>[30]</sup>。

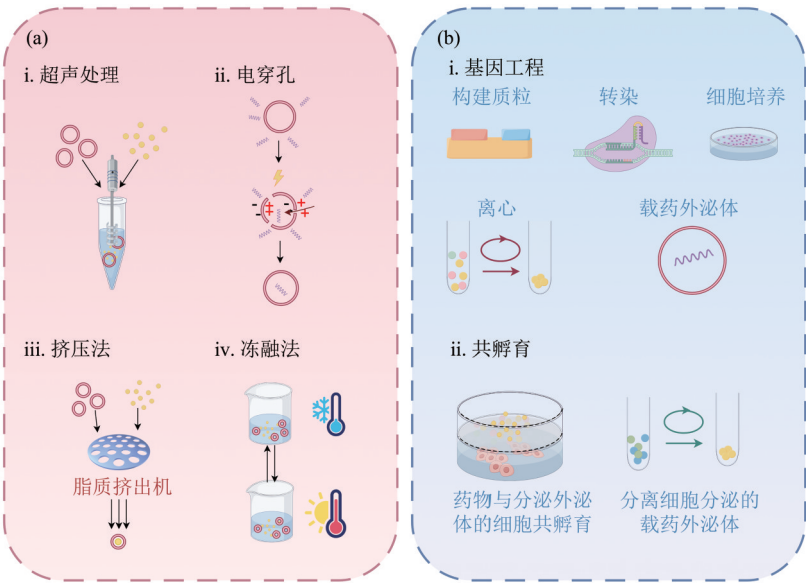


Fig. 2 Methods of exosome drug loading  
图2 外泌体的载药方法  
(a) 外源性负载; (b) 内源性负载。

2 外泌体载药系统的改善

外泌体从起始样本中分离后装载药物成为药物递送体系, 但作为递送治疗物质的工具, 需要进行工程化来进行外泌体修饰, 改善外泌体的肿瘤靶向性, 延长外泌体在肿瘤中的留存时间, 提高肿瘤部

位的药物浓度, 从而提高治疗效果。  
2.1 靶向性的提高策略  
普通外泌体缺乏特异性, 在体内广泛分布, 治疗效果较差, 常通过基因工程或物理化学方法在外泌体表面装载特异蛋白质, 实现药物靶向递送(表3)。

Table 3 Strategies on refining targeting characteristics of exosomes  
表3 改善外泌体靶向性的相关策略

| 方法   | 外泌体来源     | 治疗药物      | 连接分子 | 靶向肽     | 作用                                            | 参考文献 |
|------|-----------|-----------|------|---------|-----------------------------------------------|------|
| 基因工程 | HEK293T细胞 | 紫杉醇       | RGD  | 整合素αvβ3 | 促进肿瘤细胞凋亡, 抑制肿瘤生长                              | [31] |
|      | HEK293T细胞 | circDIDO1 | RGD  | 整合素αvβ3 | 编码DIDO1-529 aa蛋白来促进RBX1导致的泛素化和PRDX2降解从而抑制胃癌进展 | [32] |
| 化学方法 | Raw264.7  | 姜黄素、SPION | RGE  | NRP-1   | 协助姜黄素和SPION通过血脑屏障, 靶向GBM组织                    | [33] |

续表3

| 方法         | 外泌体来源   | 治疗药物        | 连接分子                           | 靶向肽 | 作用                  | 参考文献 |
|------------|---------|-------------|--------------------------------|-----|---------------------|------|
|            | HEK293T | SIRT6 siRNA | E3适配体                          | —   | 靶向递送siRNA抑制SIRT6的表达 | [34] |
| 物理方法（磁性修饰） | 间充质干细胞  | siGPX4      | Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> | —   | 借助体外磁力将外泌体靶向脑肿瘤组织   | [35] |

GBM: 胶质母细胞瘤 (glioblastoma); RGE: 神经纤毛蛋白1靶向肽 (neuropilin-1-targeted peptide, RGERPPR); RGD: 精氨酸-甘氨酸-天冬氨酸 (arginine-glycine-aspartic acid); RBX1: 环框蛋白1 (ring-box 1); PRDX2: 过氧化物酶2 (peroxiredoxin 2); SPION: 超顺磁性氧化铁纳米颗粒 (superparamagnetic iron oxide nanoparticles); SIRT6: 沉默信息调节因子2相关酶类6 (Sirtuin 6)。

基因工程构建质粒转染细胞, 促使细胞分泌工程化的外泌体。HEK293T 细胞被肿瘤来源的巨噬细胞 (tumor-associated macrophage, TAM) 靶向肽 CRVLRSGSC (CRV) 的基因构成的质粒转染, 其产生的外泌体表面负载 CRV, 将 TAM 重编程为 M1, 抑制肿瘤生长 [36]。

其次常采用化学方法, 构建化学键实现化学偶联。实验将神经皮林1靶向肽 (neuropilin-1-targeted peptide, RGERPPR, RGE) 在铜催化下通过三唑键与叠氮基偶联到外泌体膜上的炔烃基团上, 其对胶质瘤细胞的靶向性远高于与未负载 RGE 的外泌体 (94.88%/0.53%) [33]。E3 适配体-SH 与马来酰亚胺-PEG-胆固醇偶联形成偶联物。一端的胆固醇直接插入细胞膜, 偶联物与外泌体共孵育可获得 E3 适配体修饰的外泌体, 靶向前列腺癌细胞 [34]。也可借助物理方法, 例如磁性修饰外泌体结合磁场提高外泌体的靶向性: Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>核介孔 SiO<sub>2</sub>壳通过抗 CD63 抗体与装载了 siGPX4 的外泌体结合, 通过体外磁场的作用使得携带药物的外泌体聚集在脑肿瘤处 [35]。但在修饰外泌体的过程中, 部分靶向肽如乳黏蛋白会对外泌体的细胞摄取产生影响, 修饰外泌体的适配体在体内的稳定性较差, 存在易被体内核酸酶降解的问题 [37-38]。

## 2.2 留存率的提高策略

延长外泌体的留存率能够提高外泌体在靶组织中的数量, 提高治疗效果。基于外泌体自身特点, 与其他生物材料相结合, 发展出了一些提高外泌体留存率, 延长外泌体释放时间的方法。

首先, 拮抗单核细胞对外泌体的清除作用来延长其循环时间。CD47 高表达的外泌体抑制了巨噬细胞的清除作用, 能够将外泌体在循环中的留存率提高 2%, 使外泌体在肝、肺和胰腺中沉积 [39]。

然而, 目前应用较为广泛的方法为将外泌体与生物材料相结合, 特别是与水凝胶结合。水凝胶可以在组织中形成类似细胞外基质的微环境来提高外泌体的半衰期, 延长外泌体的留存时间 [40]。根据材料可分为合成水凝胶和天然水凝胶。合成水凝胶

原料为各种聚合物包括聚乙二醇 (polyethylene glycol, PEG)、聚乙烯醇等。在治疗脊髓损伤中, 甲基丙烯酸明胶制成的水凝胶与 EV 联合应用提高留存率, 改善了神经表达和轴突生长 [41]。天然水凝胶的原料则包括蛋白质、糖类等。丝绸纤维蛋白 (silk fibroin, SF) 和丝绸丝胶蛋白 (silk sericin, SS) 共同构成 SS-SF 水凝胶包裹外泌体可用于组织修复 [42]。另外, 外泌体也能够与磁性无机材料联用, 磁性氧化铁标记的外泌体在原发性乳腺癌中滞留的时间更长 [43]。

## 2.3 渗透率的提高策略

肿瘤微环境具有致密的细胞外基质 (extracellular matrix, ECM) 其中包括各类胶原蛋白、透明质酸 (hyaluronic acid, HA) 和大量的基质细胞及其分泌物阻碍纳米药物向肿瘤深处渗透 [44]。基于此, 学者利用中性粒细胞弹性蛋白酶降解肿瘤 ECM 中胶原蛋白和弹性蛋白实现药物的肿瘤渗透 [45], 或调节基质金属蛋白酶 (matrix metalloproteinases, MMPs) 活性重塑肿瘤微环境: 来自黑色素瘤细胞的 miRNA 被递送到邻近细胞后激活 MMPs [46], 或外泌体负载天然透明质酸酶 PH20, 通过分解 HA 来提高药物渗透率 [47]。

除此以外, 还能够通过外泌体表达的特异性蛋白质实现受体介导的内吞作用, 促进外泌体进入内皮细胞, 穿过各类生理屏障。二氧化硅纳米颗粒 (SiO<sub>2</sub>) 封装过氧化氢酶 (catalase, CAT) (CAT@SiO<sub>2</sub>) 后被转染到 AS1411 适配体修饰的单核巨噬细胞外泌体 (Ex-A) (CSI@Ex-A) 中, 能够通过细胞间黏附分子 1 (intercellular adhesion molecule-1, ICAM-1) 介导的途径穿过血脑屏障 [48]。DOX@lipHA-hEVs 表面的 HA 能够与癌细胞上的 CD44 特异性结合, 使肿瘤渗透深度提高 2 倍 [49]。

## 3 应用现状

外泌体作为新兴药物递送系统具有多种优势: 生物相容性高、能够穿过各类生理屏障、具有靶向

能力可将装载物递送到目标部位。聚合物作为药物载体具有各种物理化学特性如表面电荷、形状、大小等, 工程化设计更简便。但相比外泌体, 聚合物在制备过程中易残留有机溶剂导致细胞毒性大。脂质体是由脂质双层组成的球形囊泡, 直径在 50~500 nm 左右。由于脂质体的双层脂质结构与细胞质膜相似, 因此其通过与质膜融合被细胞内化。但亲脂性药物或两性药物易直接穿过脂质双层向外扩散, 药物难以保存在脂质体中, 且脂质体在体循环

内的留存时间明显短于外泌体<sup>[50]</sup>。无机纳米颗粒包括金属和非金属合成的纳米材料, 如金、银、二氧化硅等。无机纳米颗粒具有易修饰的特点, 但难以在水性介质中制作, 难以控制反应<sup>[51]</sup>。并且相对于其他载药系统, 来自于不同细胞的外泌体有特有的细胞嗜性, 能够选择性被转运到组织和器官, 这种归巢能力使它们能够穿过其他载药体系难以穿过的生物屏障。目前已有不少研究在探索用外泌体装载各类药物来治疗肿瘤(表4)。

Table 4 The therapeutic effect of exosomes for cancer  
表4 外泌体对肿瘤的治疗作用

| 装载物种类 | 装载物名称                     | 作用                                                                                  | 参考文献 |
|-------|---------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------|------|
| 抗癌药物  | 阿霉素                       | 增加靶向性和缺氧反应性, 赋予药物肿瘤穿透作用                                                             | [52] |
|       | 紫杉醇                       | 表面有RGD肽的外泌体包裹紫杉醇, 靶向胰腺癌细胞, 减少 $\alpha$ 平滑肌肌动蛋白和I型胶原蛋白, 使得外泌体能有效地穿透和内化肿瘤细胞           | [53] |
| 蛋白质   | Cas9核糖核蛋白                 | 靶向HCC生长所必需的酶: 赖氨酸乙酰转移酶5 (KAT5), 抑制肿瘤生长                                              | [54] |
|       | 免疫原性细胞死亡诱导剂               | 将免疫原性细胞死亡诱导剂加载到 $\alpha$ 乳清蛋白工程化的乳腺癌衍生外泌体上, 激活I型常规DC和引发肿瘤反应性CD8 <sup>+</sup> T细胞的反应 | [55] |
| 核酸    | siYY1和STAT3 siRNA         | 提高化疗敏感性, 逆转耐药性                                                                      | [56] |
|       | siSIRP $\alpha$ 和 siSTAT6 | 调节巨噬细胞极化为M1表型                                                                       | [57] |
|       | PAK4 siRNA                | 降低PANC-1细胞中PAK4 73%的表达量                                                             | [58] |
|       | let-7c                    | 拮抗AR和IL-6的表达和活性                                                                     | [29] |
|       | miR-7                     | 增加TNF相关细胞凋亡诱导配体的抗癌敏感性                                                               | [59] |
|       | miR-375                   | 调节Wnt5a抑制胶质母细胞瘤的增殖和侵袭                                                               | [60] |
|       | miR-151a                  | 增强肿瘤细胞对TMZ的敏感性                                                                      | [61] |
|       | miR-1246                  | 靶向上皮-间充质转化相关基因, 下调N钙黏蛋白和波形蛋白表达, 从而抑制上皮-间充质转化, 降低肿瘤的侵袭性                              | [62] |
|       | miR-203                   | 促进巨噬细胞向M1极化, 抑制前列腺癌生长                                                               | [63] |
|       | miR-124-3p                | 抑制铁还原酶, 从而抑制肝细胞的铁死亡, 降低肝的缺血再灌注损伤                                                    | [64] |

HCC: 肝细胞肝癌 (hepatocellular carcinoma); KAT5: 赖氨酸乙酰转移酶 5 (K (lysine) acetyltransferase 5); DC: 树突状细胞 (dendritic cell); AR: 雄激素受体 (androgen receptor); PANC-1: 人胰腺癌细胞 (human pancreatic carcinoma cells); TMZ: 替莫唑胺 (temozoloide); TNF: 肿瘤坏死因子 (tumor necrosis factor)。

3.1 外泌体作为癌症治疗的抗癌药物载体

阿霉素是一种有效的抗癌药物, 能降低癌症死亡率但易导致充血性心力衰竭和耐药<sup>[65]</sup>。实验将肿瘤靶向肽 iRGD (internalizing RGD peptide) 和缺氧响应性脂质掺入乳源外泌体的脂质双层中, 并包封阿霉素。具有靶向性和缺氧反应性的外泌体穿透肿瘤, 有效降低三阴性乳腺癌细胞的存活率<sup>[52]</sup>。还有研究发现, 与游离药物相比, 外泌体包裹的阿霉素降低了心脏毒性和对其他组织的不良反应<sup>[66]</sup>。紫杉醇 (paclitaxel, PTX) 是一种抗有丝分裂剂, 但在临床应用中具有生物利用度低和剂量依赖性毒性的缺点。有学者将功能配体 RGD 和磁性纳米颗粒 (magnetic nanoparticles, MNPs) 偶联到人

胰腺癌细胞 (PANC-1) 衍生的 EV 表面上, 构建了 EV (rmExo) 并将 PTX 注入其中, 构成 rmExo-PTX。注射该复合物到使用 PANC-1 细胞制备的异种移植物小鼠中, 肿瘤显著减小。其中 RGD 靶向胰腺癌细胞, 并且使用 rmExo-PTX 治疗后的肿瘤组织中  $\alpha$ 平滑肌肌动蛋白和 I 型胶原蛋白减少, 使得外泌体能有效地穿透和内化肿瘤细胞, 最终使肿瘤体积减小<sup>[53]</sup>。

3.2 外泌体作为癌症治疗的蛋白质载体

外泌体负载蛋白质/肽类药物能够提高该类药物到达靶组织的能力, 改善药物的利用度。例如, 通过电穿孔将 Cas9 核糖核蛋白加载到肝星状细胞分泌的外泌体中形成 exosome<sup>RNP</sup>, 使其靶向肝细胞

肝癌 (hepatocellular carcinoma, HCC) 生长所必需 KAT5, 抑制肿瘤生长。实验证实, exosome<sup>RNP</sup> 治疗的小鼠生存率在 50 d 时为 100%, 而 PBS 处理的对照组小鼠 50 d 后的生存率为 0%<sup>[54]</sup>。

外泌体作为肿瘤疫苗的载体也具有强大的潜力, 将免疫原性细胞死亡 (immunogenic cell death, ICD) 诱导剂加载到  $\alpha$  乳清蛋白 ( $\alpha$ -lactalbumin,  $\alpha$ -LA) 工程化的乳腺癌衍生外泌体上制备原位 DC 疫苗 (HELA-Exos), 其能激活 I 型常规 DC 并引发 CD8<sup>+</sup>T 细胞的反应, 抑制三阴性乳腺癌小鼠移植模型的肿瘤<sup>[55]</sup>。

### 3.3 外泌体作为癌症治疗的 RNA 载体

低毒性、高特异性的 siRNA 疗法被认为是治疗肿瘤的有效策略, 可用于替代各种化疗药物, siRNA 载体的缺乏是制约其发展的重要因素, 目前已有许多纳米颗粒用于装载药物, 如脂质体、无机纳米颗粒等<sup>[56, 67]</sup>。脂质体难以穿过血脑屏障, 无机纳米颗粒则存在诱导氧化应激等问题, 工程化外泌体可实现血脑屏障的有效穿透, 传递治疗药物和基因, 维持肿瘤位置上的治疗剂量<sup>[68]</sup>。

索拉非尼治疗 HCC 的主要机制为诱导铁死亡, 实验设计负载 multi-siRNA 的外泌体能靶向 HCC 细胞且沉默抑制铁死亡的基因 *GPX4* 和 *DHODH*, 来增强索拉非尼诱导的铁死亡, 增强治疗效果<sup>[69]</sup>。研究采用外泌体包裹 siYY1 和 STAT3 siRNA 靶向抑制相关基因表达, 阻断胶质母细胞瘤 (glioblastoma, GBM) 进展<sup>[56]</sup>。M1 巨噬细胞来源的外泌体装载 siSIRP $\alpha$  和 siSTAT6 诱导巨噬细胞极化为 M1 表型, 抑制肿瘤生长<sup>[57]</sup>。装载 P21 活化激酶 4 (P21-activated kinase 4, PAK4) siRNA 的外泌体降低 PANC-1 细胞中 PAK4 73% 的表达量, 增加小鼠胰腺癌模型存活率<sup>[58]</sup>。

除了 siRNA 外, 外泌体递送 miRNA 也是一种新的治疗策略: 致死 7c (let-7c) 在前列腺癌中被认为是肿瘤抑制因子, 它可以拮抗 AR 和 IL-6 的表达和活性<sup>[70-71]</sup>。因此利用肿瘤相关间充质干细胞来源的外泌体装载外源性 let-7c, 可有效抑制去势抵抗型前列腺癌复发和预防转移<sup>[29]</sup>。miR-7 增加 TNF 相关细胞凋亡诱导配体的抗癌敏感性; miR-375 通过调节 Wnt5a 抑制胶质母细胞瘤的增殖和侵袭; 外泌体 miR-151a 作用于肿瘤细胞以增强对替莫唑胺 (temozolamide, TMZ) 的敏感性<sup>[59-61]</sup>。外泌体 miR-1246 靶向上皮-间充质转化相关基因, 下调 N 钙黏蛋白和波形蛋白表达, 从而抑制上皮-间

充质转化, 降低肿瘤的侵袭性<sup>[62]</sup>。外泌体 miR-203 通过促进巨噬细胞向 M1 极化, 抑制前列腺癌生长<sup>[63]</sup>。血红素加氧酶-氧合酶 1 (heme oxygenase-1, HO-1) 转染骨髓间充质干细胞后, 其分泌的外泌体中 miR-124-3p 高表达, 抑制铁还原酶, 从而抑制肝细胞的铁死亡, 降低肝的缺血再灌注损伤<sup>[64]</sup>。

### 3.4 外泌体作为肿瘤检测的标志物

外泌体除了在治疗中发挥重要作用, 其也包含 miRNA、lncRNA、circRNA 等内容物, 因此可被视为肿瘤诊断、预测、分期的标准生物标志物。

前列腺癌是一类常见的男性肿瘤。血清前列腺特异性抗原 (prostate specific antigen, PSA) 是目前最主要的前列腺癌的诊断工具, 但 PSA 无法区分侵袭性前列腺癌。前列腺炎等非肿瘤性疾病也会出现 PSA 假阳性结果。来源于尿液的外泌体检测能够提高前列腺癌诊断的敏感性、特异性和简便性: 外泌体 miR-30b-3p 敏感性和特异性分别为 46.4% 和 88.0%; 外泌体 miR-126-3p 敏感性和特异性分别为 60.7% 和 80.0%<sup>[72]</sup>。CA19-9 作为使用最广泛的胰腺癌生物标志物, 其特异性和敏感性都较低, 胰腺癌早期隐蔽的特点也是其死亡率高的原因之一<sup>[73]</sup>。实验证实, 胰腺癌患者分泌的胰液中的外泌体 miR-21、miR-155 水平显著升高, 且结合胰液细胞学检查, 准确率可提高至 91%<sup>[74]</sup>。

## 4 目前应用局限性及未来展望

目前针对外泌体的研究大多停留在开发的初始阶段, 关键在于外泌体生产的规模化和标准化。外泌体大小的差异、表面标记物的多样性、内容物的丰富性构成了其异质性的特点。不同外泌体亚型的特征无法确定, 增加了外泌体分离的难度。不同的分离方法都有着各自的缺陷, 目前仍然没有一种技术能够同时满足纯度高、产量大的要求, 因此需要采用多种分离策略结合的方式来提高外泌体的纯度和产量。正是由于各类文献中为了满足需求所采用的分离、纯化和储存方式不同, 分离得到的外泌体可比性和重复性较差。其次外泌体的载药效率仍有待提高, 电穿孔、冻融法在载药过程中会改变外泌体尺寸和形态。不同来源的外泌体还需要在不同的温度或介质下储存, 储存条件可能会对外泌体的内容物造成影响。外泌体在分离、修饰和储存上的不稳定性限制了其临床转化的潜力。在制定药物剂量时, 需要考虑其在体内的循环时间、不良反应、施用方法等, 外泌体性能的不确定性为其使用增添了

挑战性。目前,越来越多的研究集中于探究植物来源的外泌体在肿瘤治疗中的应用<sup>[75]</sup>。

在肿瘤化疗耐药性逐渐增强,治疗效果逐渐降低的背景下,携带核酸、蛋白质和小分子药物的外泌体能够靶向运送治疗分子到肿瘤部位,实现不良反应的最低化和治疗效果最优化。因此工程化外泌体已逐渐成为肿瘤靶向治疗方法的研究热点。外泌体的低免疫原性、组织渗透性和药物的装载也为无细胞疗法的发展提供了新的选择。同时,由于健康个体和癌症患者的外泌体内容物不同,癌症患者来源的外泌体携带了癌症信息丰富的内容物或表面物质,可应用于癌症的诊断以提高诊断的精确度和灵敏度<sup>[76]</sup>。在各种来源的外泌体中,植物来源的外泌体具有很大的潜力,因为植物可以较低的成本进行大规模种植,从原材料角度提高外泌体的产量,此外它们还具有良好的安全性,降低了免疫原性的风险。随着人工智能、深度学习等计算机技术的发展,可以通过机器学习建立模型,探索可用于癌症诊断的外泌体生物标志物,提高诊断效率<sup>[77-78]</sup>。工程化外泌体的出现为肿瘤的精准治疗领域开发了新的道路,在未来具有不可估量的价值。

### 参 考 文 献

- [1] Wilcox N S, Amit U, Reibel J B, *et al.* Cardiovascular disease and cancer: shared risk factors and mechanisms. *Nat Rev Cardiol*, 2024, **21**(9): 617-631
- [2] Paskeh M D A, Entezari M, Mirzaei S, *et al.* Emerging role of exosomes in cancer progression and tumor microenvironment remodeling. *J Hematol Oncol*, 2022, **15**(1): 83
- [3] Li J, Wang J, Chen Z. Emerging role of exosomes in cancer therapy: progress and challenges. *Mol Cancer*, 2025, **24**(1): 13
- [4] Arya S B, Collie S P, Parent C A. The ins-and-outs of exosome biogenesis, secretion, and internalization. *Trends Cell Biol*, 2024, **34**(2): 90-108
- [5] Wang X, Zhao X, Zhong Y, *et al.* Biomimetic exosomes: a new generation of drug delivery system. *Front Bioeng Biotechnol*, 2022, **10**: 865682
- [6] Ye J, Li D, Jie Y, *et al.* Exosome-based nanoparticles and cancer immunotherapy. *Biomed Pharmacother*, 2024, **179**: 117296
- [7] Han L, Zhao Z, He C, *et al.* Removing the stumbling block of exosome applications in clinical and translational medicine: expand production and improve accuracy. *Stem Cell Res Ther*, 2023, **14**(1): 57
- [8] Lai J J, Chau Z L, Chen S Y, *et al.* Exosome processing and characterization approaches for research and technology development. *Adv Sci (Weinh)*, 2022, **9**(15): e2103222
- [9] Jeppesen D K, Hvam M L, Primdahl-Bengtson B, *et al.* Comparative analysis of discrete exosome fractions obtained by differential centrifugation. *J Extracell Vesicles*, 2014, **3**(1): 25011
- [10] Ansari F J, Tafti H A, Amanzadeh A, *et al.* Comparison of the efficiency of ultrafiltration, precipitation, and ultracentrifugation methods for exosome isolation. *Biochem Biophys Rep*, 2024, **38**: 101668
- [11] La Shu S, Yang Y, Allen C L, *et al.* Purity and yield of melanoma exosomes are dependent on isolation method. *J Extracell Vesicles*, 2020, **9**(1): 1692401
- [12] Takov K, Yellon D M, Davidson S M. Comparison of small extracellular vesicles isolated from plasma by ultracentrifugation or size-exclusion chromatography: yield, purity and functional potential. *J Extracell Vesicles*, 2019, **8**(1): 1560809
- [13] Jalaludin I, Lubman D M, Kim J. A guide to mass spectrometric analysis of extracellular vesicle proteins for biomarker discovery. *Mass Spectrom Rev*, 2023, **42**(2): 844-872
- [14] Chen Y, Zhu Q, Cheng L, *et al.* Exosome detection via the ultrafast-isolation system: exodus. *Nat Methods*, 2021, **18**(2): 212-218
- [15] Zhou Z, Chen Y, Qian X. Target-specific exosome isolation through aptamer-based microfluidics. *Biosensors: Basel*, 2022, **12**(4): 257
- [16] Soda N, Rehm B H A, Sonar P, *et al.* Advanced liquid biopsy technologies for circulating biomarker detection. *J Mater Chem B*, 2019, **7**(43): 6670-6704
- [17] Bobrie A, Colombo M, Krumeich S, *et al.* Diverse subpopulations of vesicles secreted by different intracellular mechanisms are present in exosome preparations obtained by differential ultracentrifugation. *J Extracell Vesicles*, 2012, **1**(1): 18397
- [18] Chen Z, Cheng S B, Cao P, *et al.* Detection of exosomes by ZnO nanowires coated three-dimensional scaffold chip device. *Biosens Bioelectron*, 2018, **122**: 211-216
- [19] Bai H H, Wang X F, Zhang B Y, *et al.* A comparison of size exclusion chromatography-based tandem strategies for plasma exosome enrichment and proteomic analysis. *Anal Methods*, 2023, **15**(45): 6245-6251
- [20] Yang Y, Zhang L, Jin K, *et al.* Self-adaptive virtual microchannel for continuous enrichment and separation of nanoparticles. *Sci Adv*, 2022, **8**(30): eabn8440
- [21] Kooijmans S A A, Stremersch S, Braeckmans K, *et al.* Electroporation-induced siRNA precipitation obscures the efficiency of siRNA loading into extracellular vesicles. *J Control Release*, 2013, **172**(1): 229-238
- [22] Ma C, Liu K, Wang F, *et al.* Neutrophil membrane-engineered Panax ginseng root-derived exosomes loaded miRNA 182-5p targets NOX4/Drp-1/NLRP3 signal pathway to alleviate acute lung injury in sepsis: experimental studies. *Int J Surg*, 2024, **110**(1): 72-86
- [23] Gu J, You J, Liang H, *et al.* Engineered bone marrow mesenchymal stem cell-derived exosomes loaded with miR302 through the cardiomyocyte specific peptide can reduce myocardial ischemia and reperfusion (I/R) injury. *J Transl Med*, 2024, **22**(1): 168
- [24] Lamichhane T N, Jeyaram A, Patel D B, *et al.* Oncogene knockdown via active loading of small RNAs into extracellular

- vesicles by sonication. *Cell Mol Bioeng*, 2016, **9**(3): 315-324
- [25] Tian J, Han Z, Song D, *et al*. Engineered exosome for drug delivery: recent development and clinical applications. *Int J Nanomedicine*, 2023, **18**: 7923-7940
- [26] Cheng Y, Zeng Q, Han Q, *et al*. Effect of pH, temperature and freezing-thawing on quantity changes and cellular uptake of exosomes. *Protein Cell*, 2019, **10**(4): 295-299
- [27] Hosseini N F, Amini R, Ramezani M, *et al*. AS1411 aptamer-functionalized exosomes in the targeted delivery of doxorubicin in fighting colorectal cancer. *Biomed Pharmacother*, 2022, **155**: 113690
- [28] Chen M, Li Y, Ma N, *et al*. Mesenchymal stem cell-derived exosomes loaded with 5-Fu against cholangiocarcinoma *in vitro*. *Mol Med Rep*, 2022, **25**(6): 213
- [29] Kurniawati I, Liu M C, Hsieh C L, *et al*. Targeting castration-resistant prostate cancer using mesenchymal stem cell exosomes for therapeutic microRNA-let-7c delivery. *Front Biosci (Landmark Ed)*, 2022, **27**(9): 256
- [30] Gunár K, Kotrchová L, Filipová M, *et al*. The transmission and toxicity of polymer-bound doxorubicin-containing exosomes derived from human adenocarcinoma cells. *Nanomedicine (Lond)*, 2022, **17**(19): 1307-1322
- [31] Creeden J F, Sevier J, Zhang J T, *et al*. Smart exosomes enhance PDAC targeted therapy. *J Control Release*, 2024, **368**: 413-429
- [32] Guo Z, Zhang Y, Xu W, *et al*. Engineered exosome-mediated delivery of circDIDO1 inhibits gastric cancer progression via regulation of miR-1307-3p/SOCS<sub>2</sub> axis. *J Transl Med*, 2022, **20**(1): 326
- [33] Jia G, Han Y, An Y, *et al*. NRP-1 targeted and cargo-loaded exosomes facilitate simultaneous imaging and therapy of glioma *in vitro* and *in vivo*. *Biomaterials*, 2018, **178**: 302-316
- [34] Han Q, Xie Q R, Li F, *et al*. Targeted inhibition of SIRT6 via engineered exosomes impairs tumorigenesis and metastasis in prostate cancer. *Theranostics*, 2021, **11**(13): 6526-6541
- [35] Li B, Chen X, Qiu W, *et al*. Synchronous disintegration of ferroptosis defense axis via engineered exosome-conjugated magnetic nanoparticles for glioblastoma therapy. *Adv Sci*, 2022, **9**(17): 2105451
- [36] Zhang L, Lin Y, Li S, *et al*. *In situ* reprogramming of tumor-associated macrophages with internally and externally engineered exosomes. *Angew Chem Int Ed*, 2023, **62**(11): e202217089
- [37] Longatti A, Schindler C, Collinson A, *et al*. High affinity single-chain variable fragments are specific and versatile targeting motifs for extracellular vesicles. *Nanoscale*, 2018, **10**(29): 14230-14244
- [38] Wu Y, Cao Y, Chen L, *et al*. Role of exosomes in cancer and aptamer-modified exosomes as a promising platform for cancer targeted therapy. *Biol Proced Online*, 2024, **26**(1): 15
- [39] Kamerkar S, LeBleu V S, Sugimoto H, *et al*. Exosomes facilitate therapeutic targeting of oncogenic KRAS in pancreatic cancer. *Nature*, 2017, **546**(7659): 498-503
- [40] Zhang Y, Jiao L, Lu L, *et al*. The mechanisms underlying the beneficial effects of stem cell-derived exosomes in repairing ischemic tissue injury. *J Cardiovasc Transl Res*, 2022, **15**(3): 524-534
- [41] Cheng J, Chen Z, Liu C, *et al*. Bone mesenchymal stem cell-derived exosome-loaded injectable hydrogel for minimally invasive treatment of spinal cord injury. *Nanomedicine*, 2021, **16**(18): 1567-1579
- [42] Han C, Liu F, Zhang Y, *et al*. Human umbilical cord mesenchymal stem cell derived exosomes delivered using silk fibroin and sericin composite hydrogel promote wound healing. *Front Cardiovasc Med*, 2021, **8**: 713021
- [43] Toomajian V A, Tundo A, Ural E E, *et al*. Magnetic particle imaging reveals that iron-labeled extracellular vesicles accumulate in brains of mice with metastases. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2024, **16**(24): 30860-30873
- [44] Sleetboom J J F, van Tienderen G S, Schenke-Layland K, *et al*. The extracellular matrix as hallmark of cancer and metastasis: from biomechanics to therapeutic targets. *Sci Transl Med*, 2024, **16**(728): eadg3840
- [45] Li Y J, Wu J Y, Hu X B, *et al*. Biomimetic liposome with surface-bound elastase for enhanced tumor penetration and chemotherapeutic. *Adv Health Mater*, 2021, **10**(19): 2100794
- [46] Hood J L, San R S, Wickline S A. Exosomes released by melanoma cells prepare sentinel lymph nodes for tumor metastasis. *Cancer Res*, 2011, **71**(11): 3792-3801
- [47] Feng C, Xiong Z, Wang C, *et al*. Folic acid-modified Exosome-PH20 enhances the efficiency of therapy via modulation of the tumor microenvironment and directly inhibits tumor cell metastasis. *Bioact Mater*, 2021, **6**(4): 963-974
- [48] Wu T, Liu Y, Cao Y, *et al*. Engineering macrophage exosome disguised biodegradable nanoplateform for enhanced sonodynamic therapy of glioblastoma. *Adv Mater*, 2022, **34**(15): 2110364
- [49] Liu J, Ye Z, Xiang M, *et al*. Functional extracellular vesicles engineered with lipid-grafted hyaluronic acid effectively reverse cancer drug resistance. *Biomaterials*, 2019, **223**: 119475
- [50] Johnsen K B, Gudbergsson J M, Duroux M, *et al*. On the use of liposome controls in studies investigating the clinical potential of extracellular vesicle-based drug delivery systems-a commentary. *J Control Release*, 2018, **269**: 10-14
- [51] Wei Q Y, Xu Y M, Lau A T Y. Recent progress of nanocarrier-based therapy for solid malignancies. *Cancers: Basel*, 2020, **12**(10): E2783
- [52] Pullan J, Dailey K, Bhallamudi S, *et al*. Modified bovine milk exosomes for doxorubicin delivery to triple-negative breast cancer cells. *ACS Appl Bio Mater*, 2022, **5**(5): 2163-2175
- [53] Al Faruque H, Choi E S, Kim J H, *et al*. Enhanced effect of autologous EVs delivering paclitaxel in pancreatic cancer. *J Control Release*, 2022, **347**: 330-346
- [54] Wan T, Zhong J, Pan Q, *et al*. Exosome-mediated delivery of Cas9 ribonucleoprotein complexes for tissue-specific gene therapy of liver diseases. *Sci Adv*, 2022, **8**(37): eabp9435
- [55] Huang L, Rong Y, Tang X, *et al*. Engineered exosomes as an *in situ* DC-primed vaccine to boost antitumor immunity in breast cancer.

- Mol Cancer, 2022, **21**(1): 45
- [56] Liu X, Cao Z, Liu N, *et al.* Kill two birds with one stone: engineered exosome-mediated delivery of cholesterol modified YY1-siRNA enhances chemoradiotherapy sensitivity of glioblastoma. *Front Pharmacol*, 2022, **13**: 975291
- [57] Taghavi-Farahabadi M, Mahmoudi M, Mojtavavi N, *et al.* Enhancing the anti-tumor activity and reprogramming M2 macrophages by delivering siRNAs against SIRP $\alpha$  and STAT6 via M1 exosomes and combining with anti-PD-L1. *Life Sci*, 2025, **361**: 123311
- [58] Xu L, Faruqi F N, Lim Y M, *et al.* Exosome-mediated RNAi of PAK4 prolongs survival of pancreatic cancer mouse model after loco-regional treatment. *Biomaterials*, 2021, **264**: 120369
- [59] Zhang X, Zhang X, Hu S, *et al.* Identification of miRNA-7 by genome-wide analysis as a critical sensitizer for TRAIL-induced apoptosis in glioblastoma cells. *Nucleic Acids Res*, 2017, **45**(10): 5930-5944
- [60] Li G F, Cheng Y Y, Li B J, *et al.* miR-375 inhibits the proliferation and invasion of glioblastoma by regulating Wnt5a. *Neoplasma*, 2019, **66**(3): 350-356
- [61] Zeng A, Wei Z, Yan W, *et al.* Exosomal transfer of miR-151a enhances chemosensitivity to temozolomide in drug-resistant glioblastoma. *Cancer Lett*, 2018, **436**: 10-21
- [62] Bhagirath D, Yang T L, Bucay N, *et al.* microRNA-1246 is an exosomal biomarker for aggressive prostate cancer. *Cancer Res*, 2018, **78**(7): 1833-1844
- [63] Zhang L S, Chen Q C, Zong H T, *et al.* Exosome miRNA-203 promotes M1 macrophage polarization and inhibits prostate cancer tumor progression. *Mol Cell Biochem*, 2024, **479**(9): 2459-2470
- [64] Wu L, Tian X, Zuo H, *et al.* miR-124-3p delivered by exosomes from heme oxygenase-1 modified bone marrow mesenchymal stem cells inhibits ferroptosis to attenuate ischemia-reperfusion injury in steatotic grafts. *J Nanobiotechnology*, 2022, **20**(1): 196
- [65] Pullan J E, Confeld M I, Osborn J K, *et al.* Exosomes as drug carriers for cancer therapy. *Mol Pharm*, 2019, **16**(5): 1789-1798
- [66] Théry C, Witwer K W, Aikawa E, *et al.* Minimal information for studies of extracellular vesicles 2018 (MISEV2018): a position statement of the International Society for Extracellular Vesicles and update of the MISEV2014 guidelines. *J Extracell Vesicles*, 2018, **7**(1): 1535750
- [67] Ruan H, Chai Z, Shen Q, *et al.* A novel peptide ligand RAP12 of LRP1 for glioma targeted drug delivery. *J Control Release*, 2018, **279**: 306-315
- [68] Ajdary M, Moosavi M A, Rahmati M, *et al.* Health concerns of various nanoparticles: a review of their *in vitro* and *in vivo* toxicity. *Nanomaterials (Basel)*, 2018, **8**(9): E634
- [69] Li X, Yu Q, Zhao R, *et al.* Designer exosomes for targeted delivery of a novel therapeutic cargo to enhance sorafenib-mediated ferroptosis in hepatocellular carcinoma. *Front Oncol*, 2022, **12**: 898156
- [70] Johnson S M, Grosshans H, Shingara J, *et al.* RAS is regulated by the let-7 microRNA family. *Cell*, 2005, **120**(5): 635-647
- [71] Malinowska K, Neuwirt H, Cavarretta I T, *et al.* Interleukin-6 stimulation of growth of prostate cancer *in vitro* and *in vivo* through activation of the androgen receptor. *Endocr Relat Cancer*, 2009, **16**(1): 155-169
- [72] Matsuzaki K, Fujita K, Tomiyama E, *et al.* miR-30b-3p and miR-126-3p of urinary extracellular vesicles could be new biomarkers for prostate cancer. *Transl Androl Urol*, 2021, **10**(4): 1918-1927
- [73] Goonetilleke K S, Siriwardena A K. Systematic review of carbohydrate antigen (CA 19-9) as a biochemical marker in the diagnosis of pancreatic cancer. *Eur J Surg Oncol*, 2007, **33**(3): 266-270
- [74] Nakamura S, Sadakari Y, Ohtsuka T, *et al.* Pancreatic juice exosomal microRNAs as biomarkers for detection of pancreatic ductal adenocarcinoma. *Ann Surg Oncol*, 2019, **26**(7): 2104-2111
- [75] Yi C, Lu L, Li Z, *et al.* Plant-derived exosome-like nanoparticles for microRNA delivery in cancer treatment. *Drug Deliv Transl Res*, 2025, **15**(1): 84-101
- [76] Yu W, Hurley J, Roberts D, *et al.* Exosome-based liquid biopsies in cancer: opportunities and challenges. *Ann Oncol*, 2021, **32**(4): 466-477
- [77] Cai Z R, Zheng Y Q, Hu Y, *et al.* Construction of exosome non-coding RNA feature for non-invasive, early detection of gastric cancer patients by machine learning: a multi-cohort study. *Gut*, 2025. Doi: 10.1136/gutnl-2024-333522
- [78] Yang Z, University F, Tian T, *et al.* ChatExosome: an artificial intelligence (AI) agent based on deep learning of exosomes spectroscopy for hepatocellular carcinoma (HCC) diagnosis. *Anal Chem*, 2025, **97**(8): 4643-4652

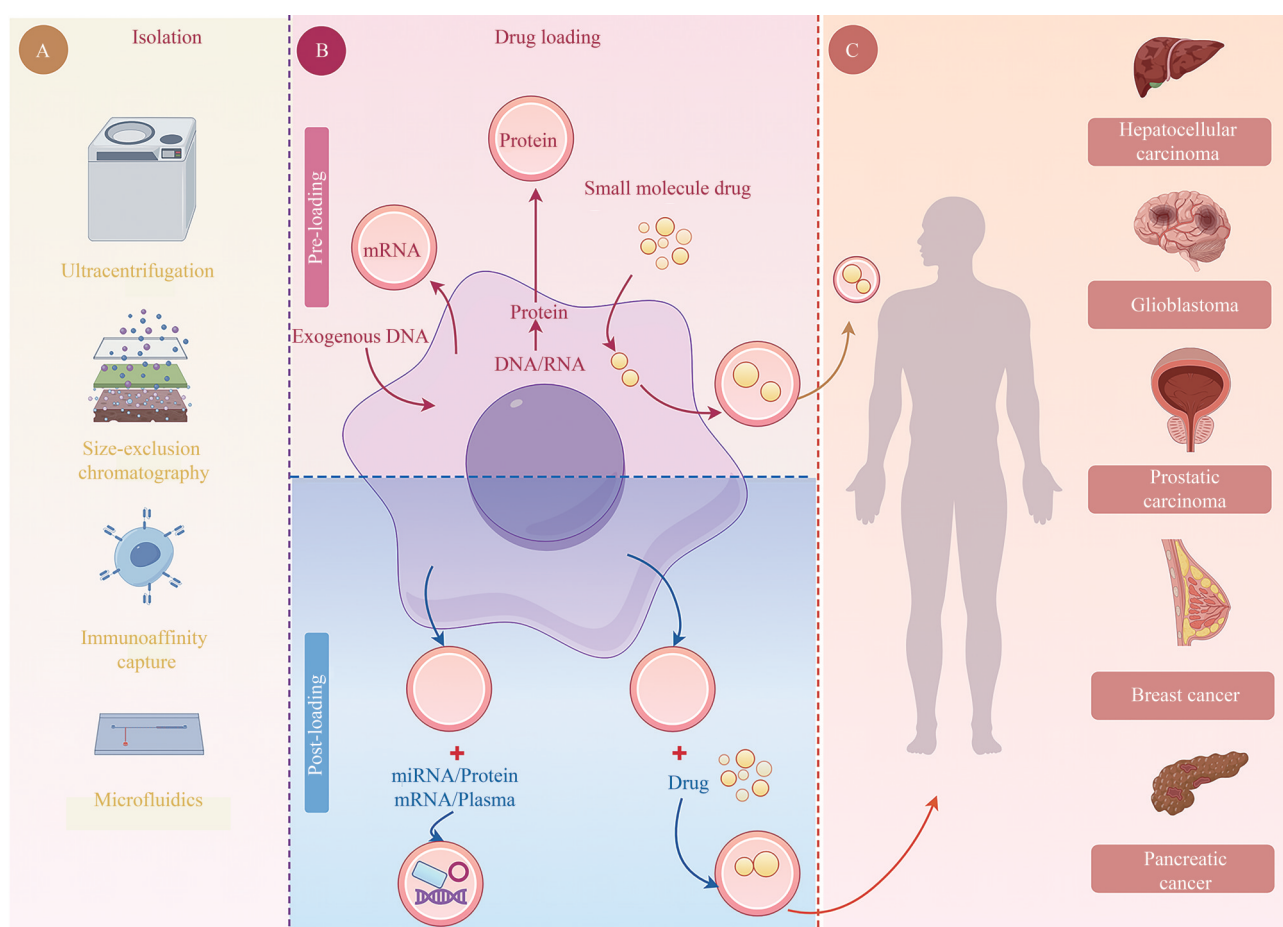
## Application of Engineered Exosomes in Tumor-targeted Therapy\*

SONG Jia-Lu<sup>1)</sup>, JIN Yi-Xin<sup>1)</sup>, MU Xing-Yu<sup>1)</sup>, JIANG Yu-Huan<sup>1)</sup>, WANG Jing<sup>1,2)\*\*</sup>

<sup>1)</sup>State Key Laboratory of Oral Diseases & National Center for Stomatology & National Clinical Research Center for Oral Diseases,  
West China Hospital of Stomatology, Sichuan University, Chengdu 610041, China;

<sup>2)</sup>Department of Implantology, West China Hospital of Stomatology, Sichuan University, Chengdu 610041, China)

### Graphical abstract



**Abstract** Tumors are the second leading cause of death worldwide. Exosomes are a type of extracellular vesicle secreted from multivesicular bodies, with particle sizes ranging from 40 to 160 nm. They regulate the tumor microenvironment, proliferation, and progression by transporting proteins, nucleic acids, and other biomolecules.

\* This work was supported by grants from the Natural Science Foundation of Sichuan Province (2024NSFSC1598) and West China Hospital of Stomatology, Sichuan University (LCYJ-ZD-202303).

\*\* Corresponding author.

Tel: 86-15927209322, E-mail: wj18334721002@163.com

Received: October 10, 2024 Accepted: March 4, 2025

Compared with other drug delivery systems, exosomes derived from different cells possess unique cellular tropism, enabling them to selectively target specific tissues and organs. This homing ability allows them to cross biological barriers that are otherwise difficult for conventional drug delivery systems to penetrate. Due to their biocompatibility and unique biological properties, exosomes can serve as drug delivery systems capable of loading various anti-tumor drugs. They can traverse biological barriers, evade immune responses, and specifically target tumor tissues, making them ideal carriers for anti-tumor therapeutics. This article systematically summarizes the methods for exosome isolation, including ultracentrifugation, ultrafiltration, size-exclusion chromatography (SEC), immunoaffinity capture, and microfluidics. However, these methods have certain limitations. A combination of multiple isolation techniques can improve isolation efficiency. For instance, combining ultrafiltration with SEC can achieve both high purity and high yield while reducing processing time. Exosome drug loading methods can be classified into post-loading and pre-loading approaches. Pre-loading is further categorized into active and passive loading. Active loading methods, including electroporation, sonication, extrusion, and freeze-thaw cycles, involve physical or chemical disruption of the exosome membrane to facilitate drug encapsulation. Passive loading relies on drug concentration gradients or hydrophobic interactions between drugs and exosomes for encapsulation. Pre-loading strategies also include genetic engineering and co-incubation methods. Additionally, we review approaches to enhance the targeting, retention, and permeability of exosomes. Genetic engineering and chemical modifications can improve their tumor-targeting capabilities. Magnetic fields can also be employed to promote the accumulation of exosomes at tumor sites. Retention time can be prolonged by inhibiting monocyte-mediated clearance or by combining exosomes with hydrogels. Engineered exosomes can also reshape the tumor microenvironment to enhance permeability. This review further discusses the current applications of exosomes in delivering various anti-tumor drugs. Specifically, exosomes can encapsulate chemotherapeutic agents such as paclitaxel to reduce side effects and increase drug concentration within tumor tissues. For instance, exosomes loaded with doxorubicin can mitigate cardiotoxicity and minimize adverse effects on healthy tissues. Furthermore, exosomes can encapsulate proteins to enhance protein stability and bioavailability or carry immunogenic cell death inducers for tumor vaccines. In addition to these applications, exosomes can deliver nucleic acids such as siRNA and miRNA to regulate gene expression, inhibit tumor proliferation, and suppress invasion. Beyond their therapeutic applications, exosomes also serve as tumor biomarkers for early cancer diagnosis. The detection of exosomal miRNA can improve the sensitivity and specificity of diagnosing prostate and pancreatic cancers. Despite their promising potential as drug delivery systems, challenges remain in the standardization and large-scale production of exosomes. This article explores the future development of engineered exosomes for targeted tumor therapy. Plant-derived exosomes hold potential due to their superior biocompatibility, lower toxicity, and abundant availability. Furthermore, the integration of exosomes with artificial intelligence may offer novel applications in diagnostics, therapeutics, and personalized medicine.

**Key words** engineered exosome, cancer, targeted therapy

**DOI:** 10.16476/j.pibb.2024.0430

**CSTR:** 32369.14.pibb.20240430