



细胞外囊泡的靶细胞摄取机制及其在疾病诊疗中的应用*

黄宁宁¹⁾ 齐莉莉^{2)**} 王进波²⁾ 王梦婷²⁾ 吴玉琴³⁾

(¹⁾ 浙江理工大学生命科学与医药学院, 杭州 310018; (²⁾ 浙大宁波理工学院生物与化学工程学院, 宁波 315100;

(³⁾ 浙江省新华医院生活方式医学门诊, 杭州 310005)

摘要 细胞外囊泡 (EVs) 是细胞分泌的纳米级小囊泡, 在细胞间通讯中发挥重要作用。它们通过配体-受体结合、内吞作用、膜融合的方式被靶细胞摄取, 从而执行生物学功能。在疾病诊断方面, EVs 的组分可作为疾病诊断中的生物标志物, 能够揭示其起源细胞的病理变化。在疾病治疗方面, EVs 具有靶向递送的潜力, 不仅可以作为疫苗开发的平台, 还能被设计成药物递送系统, 将药物直接运送到特定的细胞或组织。此外, EVs 本身也可作为治疗剂用于自身免疫性疾病和癌症的治疗。本文总结 EVs 的生成过程和它们的摄取机制, 同时探讨 EVs 在疾病诊断和治疗领域的最新研究进展。

关键词 细胞外囊泡, 摄取机制, 疾病诊断, 疾病治疗

中图分类号 Q248, R446

DOI: 10.16476/j.pibb.2024.0156

细胞外囊泡 (extracellular vesicles, EVs) 是分泌到胞外空间的双层脂质结构, 包含与亲本细胞相似的生物活性成分, 通常含有蛋白质、核苷酸、脂质和小分子代谢产物等^[1]。EVs 平均直径 40~1 000 nm, 根据 EVs 的生物发生、释放途径、大小和功能可分为三种亚型: 微囊泡、外泌体和凋亡小体 (图 1)^[2-3]。EVs 在生物体内扮演着重要角色, 作为天然的载体系统, 能够将分子货物传递给受体细胞, 从而参与细胞间通讯及免疫应答、抗原提呈、肿瘤发生等多种生理和病理过程^[4-6]。近年来, EVs 的生理功能、在疾病发生中的作用及其作为疾病诊疗递送载体的研究已成为热门。在其生理作用过程中, EVs 与靶细胞相互作用、被靶细胞内化及在靶细胞中发挥作用的机制十分关键。本文主要针对 EVs 的摄取机制及其在疾病诊疗中的应用进行综述。

1 EVs 的产生

EVs 的产生是一个复杂的生理过程。细胞膜首先向内凹陷形成杯状结构, 细胞表面蛋白质与细胞外环境相关的可溶性蛋白选择性包装, 形成早期内

体; 早期内体转化为晚期分选内体后, 在转运必需的内体分选复合体 (endosomal sorting complex required for transport, ESCRT)、Rab-GTPase 家族和四跨膜蛋白等作用下形成多泡体向质膜转运并与质膜融合, 促使 EVs 分泌到细胞外^[7]。ESCRT-0、ESCRT-I 和 ESCRT-II 负责识别泛素化货物并将其加载到内体腔中; ESCRT-III 蛋白经 ESCRT-II 激活后, 募集辅助蛋白 ALIX 和 VPS4, 以协调多泡体腔内囊泡的形成; 四跨膜蛋白 (如 CD63) 在 EVs 的形成、分泌、货物分选以及细胞间通讯中发挥着多方面的作用; RAS 相关蛋白 RAB27A、RAB27B 则是质膜分泌 EVs 必需的^[7-11]。EVs 上的跨膜蛋白主要组织相容性复合体 II 类分子 (major histocompatibility complex class II molecules, MHC II)、四跨膜蛋白和细胞间黏附分子 1 (intercellular cell adhesion molecule-1, ICAM-1)

* 国家重点研发计划 (2022YFD1300301), 宁波市重大科技攻关暨“揭榜挂帅”项目 (2021Z112、2018B10095), 宁波市科技特派员项目 (2022S225) 和宁波市自然科学基金 (2023J270) 资助。

** 通讯联系人。

Tel: 13957858287, E-mail: qll@nbt.edu.cn

收稿日期: 2024-04-16, 接受日期: 2024-06-20

通过与受体细胞表面的受体结合来发挥作用^[3, 12-14]。EVs与受体细胞接触后, 触发下游信号通路或经受体细胞摄取发挥作用。靶细胞摄取EVs的机制主要包括膜融合和内吞作用。这两种机制可以单独或共同作用, 从而确保EVs被靶细胞有效摄取和利用^[15-16]。

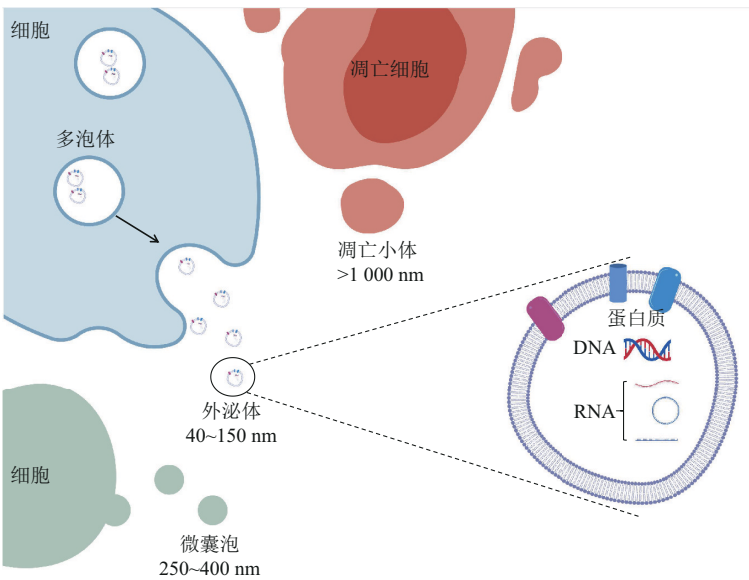


Fig. 1 Schematic illustration of the biogenesis of apoptotic bodies, microvesicles, and exosomes (created with gdp.renlab.cn)
图1 凋亡小体、微囊泡和外泌体的生物发生示意图 (使用gdp.renlab.cn绘制)

2 EVs的摄取

EVs与靶细胞相互作用进而发挥生理作用的方式主要有3种: 受体-配体相互作用、膜融合和内吞作用(图2)。

2.1 细胞外囊泡与靶细胞间的配体-受体相互作用

EVs可通过与靶细胞膜上的胞外受体分子相互作用, 进而发挥生理作用。在参与免疫功能和细胞凋亡过程调节时, EVs可通过与受体相互作用而发挥作用。树突状细胞(dendritic cell, DC)产生的

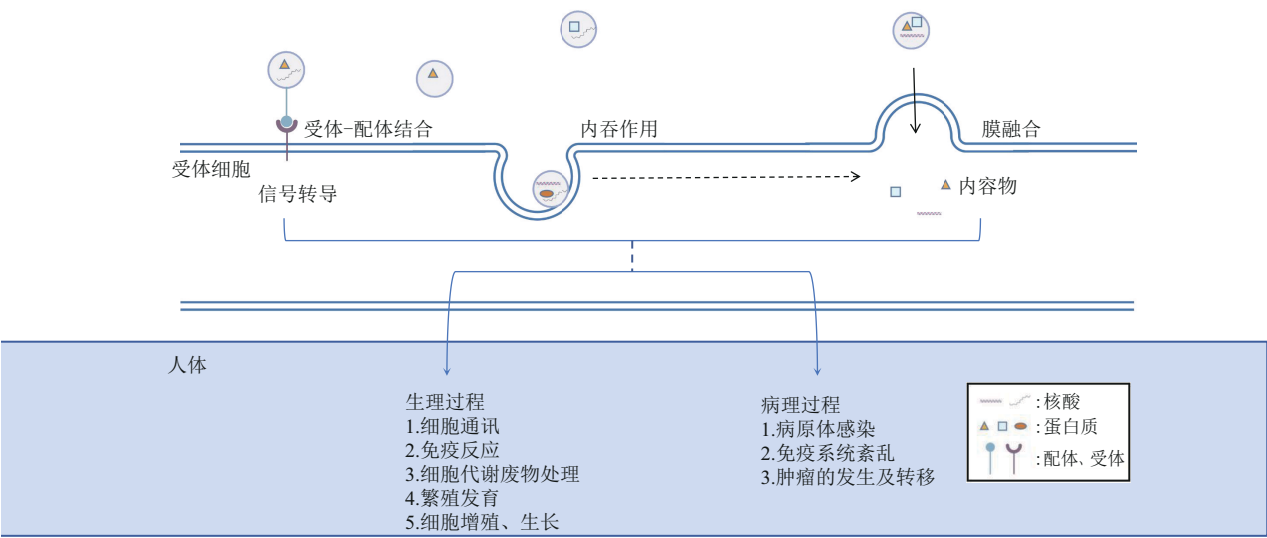


Fig. 2 Mechanisms of EVs uptake and internalization, and their roles in physiological and pathological processes (created with gdp.renlab.cn)

图2 细胞外囊泡摄取内化机制及其在生理和病理过程中的主要作用 (使用gdp.renlab.cn绘制)

EVs通过与MHC互作,激活T淋巴细胞,进而发挥免疫调节作用^[17]。脐带血来源的EVs可通过膜表面的MHC-I、MHC-II和四跨膜蛋白(CD34、CD80)刺激T细胞增殖,进而发挥抗肿瘤作用^[18]。DC产生的EVs膜上可表达肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor α , TNF- α)、Fas配体(Fas ligand, FasL)和TNF相关凋亡诱导配体(TNF-related apoptosis-inducing ligand, TRAIL)等蛋白质分子,这些蛋白质分子可与肿瘤细胞表面的TNF- α 受体相结合,进而诱导肿瘤细胞凋亡级联反应,促进肿瘤细胞凋亡^[19]。

2.2 细胞外囊泡与靶细胞的膜融合

EVs的脂质膜与靶细胞膜的磷脂双分子层发生疏水融合,进而EVs进入靶细胞内。SNAREs和Rab蛋白可能在这一过程中发挥重要作用^[20-21]。EVs膜上的脂筏样结构域、整合素(Integrins)和黏附因子在EVs与靶细胞相互作用、黏附及内化等过程中发挥重要生理作用^[16]。EVs膜融合过程受pH值变化的影响。用质子泵抑制剂预处理以改变胞内pH值,可以抑制黑色素瘤细胞对EVs的摄取^[22-23]。干扰素诱导的跨膜蛋白(IFITM)可阻断EVs与受体细胞膜之间的膜融合,进而抑制EVs活性分子的释放^[24]。有研究发现,EVs表面含有较高水平的乳脂球表皮生长因子8(milk fat globule-EGF-factor VIII, MFG-E8),该分子能够与免疫细胞表面表达的整合素相结合,从而使EVs靶向至抗原呈递细胞(主要是DC和巨噬细胞)^[25-26]。为了追踪EVs进入细胞的动态过程,利用罗丹明(R18)标记EVs,并与DC、骨髓基质细胞相互作用,结果发现,受体细胞膜有大量荧光存在,这证明了EVs可通过膜融合方式进入靶细胞^[27-28]。此外,用PKH26、PKH67、DIR等荧光染料标记EVs,再应用荧光显微镜和流式细胞术中进行可视化检测,可观察到EVs与靶细胞膜融合的典型证据^[29]。

2.3 内吞作用

内吞作用是EVs传递信号的常见摄取方式之一。内吞作用有多种不同途径:网格蛋白依赖途径、洞穴蛋白介导的摄取、巨胞饮作用、吞噬作用和脂筏介导的内吞作用等(表1)^[30-31]。

2.3.1 网格蛋白和小窝蛋白介导的内吞

EVs可以通过网格蛋白介导的内吞作用被细胞摄取,从而介导细胞间的通讯^[32-34]。心肌细胞通过网格蛋白介导的内吞作用有效地捕获循环系统中

的EVs,这一过程,衔接蛋白2(adaptor protein 2, AP-2)、衔接子相关蛋白激酶(adaptor-associated kinase 1, AAK1)等因子参与识别和包裹含有miR-214的EVs^[35]。用内吞抑制剂处理或siRNA敲低进行的研究表明,大鼠肾上腺嗜铬细胞瘤细胞(rat pheochromocytoma cell, PC12)通过网格蛋白介导的内吞作用摄取EVs^[15]。小窝蛋白(caveolin)亦可介导EVs的内吞作用。多种药物抑制剂可靶向胆固醇分子,抑制小窝的形成,进而阻碍EVs的摄取^[36]。人上皮细胞通过小窝蛋白介导的内吞作用将B细胞衍生的EVs内化,用动力抑制剂处理或敲低caveolin-1,即可抑制EVs的内化^[37]。肠上皮细胞通过小窝蛋白介导的内吞作用特异性摄取生姜EVs,下调NF- κ B、IL-6、IL-8和TNF- α 等促炎因子的表达和分泌,抑制脂多糖诱导的炎症反应^[38]。

2.3.2 脂筏介导的内吞作用

脂筏在EVs的内吞过程中可能发挥关键性作用,EVs及其靶细胞的脂质组成会影响该摄取过程^[39-41]。甲基- β -环糊精(methyl- β -cyclodextrin, M β CD)能够抑制脂筏参与的EVs内化过程,随着M β CD浓度升高,人脐静脉内皮细胞对EVs的摄取减少约60%。免疫电镜的共定位分析进一步揭示,EVs与脂筏标记物flotillin-1共定位,这证实了EVs确实通过脂筏途径被细胞摄取的^[42]。EVs通过膜脂筏结构域被黏附、摄取,膜联蛋白AnxA2、AnxA6是这一摄取机制所必需的。AnxA2是EVs锚定到质膜的脂筏结构域,AnxA6则可将EVs运输至内体区。激光共聚焦显微镜观察发现,绿色荧光蛋白(green fluorescent protein, GFP)标记EVs与霍乱毒素B标记的脂筏共定位,这表明EVs通过脂筏途径被靶细胞摄取^[43]。

2.3.3 吞噬作用

吞噬作用依靠特定的细胞识别和摄取胞外环境中的颗粒状物质。在吞噬作用中,细胞膜结构改变以包裹胞外颗粒,形成吞噬小体,进而将其内化^[44]。磷脂酰肌醇3激酶(PI3K)和磷酸酯酶C(PLC)对吞噬小体的形成是必需的。发动蛋白2(dynamin 2, Dyn2)是吞噬作用的重要调节因子,敲除Dyn2可抑制细胞骨架和PI3K参与的吞噬作用,吞噬细胞能够有效地通过吞噬作用内化来自人类白血病细胞系K562、MT4等细胞的EVs,当Dyn2的表达水平降低时,EVs的摄取过程几乎完全被抑制^[45]。K562、MT4等细胞释放的EVs可被

RAW 264.7细胞有效吞噬内化, 该过程与巨噬细胞肌动蛋白的聚合及PI3K信号通路的活化密切相关^[45]。通过荧光共聚焦显微镜证实骨肉瘤细胞EVs可被巨噬细胞吞噬^[46]。

2.3.4 巨胞饮作用

巨胞饮作用通过质膜褶皱包裹内吞物形成囊泡将活性分子运输至胞内。巨胞饮作用依赖于细胞内吞和膜运输相关的蛋白质SNX5、SNX9、CtBP/BARS以及磷酸肌醇等因子的参与^[47-49]。用巨胞饮抑制剂EIPA、LY294002处理PC12细胞后, 该细胞摄取EVs的效率显著下降^[15]。经EIPA等处理后, HeLa细胞对EVs的摄取效率显著下降, Rac1、丝氨酸/苏氨酸激酶(P21-activated kinase 1, PAK1)等蛋白质因子参与该过程^[16]。丙咪唑、苯苄胺、长春碱等小分子抑制剂均可通过抑制巨胞饮作用, 抑制EVs的摄取^[24, 50-51]。巨胞饮作用在细胞内外环境物质交换、营养物质摄取等方面发挥关

键作用, 是细胞内吞EVs的有效路径。

2.3.5 丝状伪足与硫酸乙酰肝素蛋白多糖(HSPG)介导的内吞作用

丝状伪足是由感知环境信号的肌动蛋白丝形成的细胞突起。该结构不仅增加了细胞与EVs的相互作用接触面积, 还因其活跃的肌动蛋白重塑能力而在内吞过程中发挥关键作用, 这一过程类似于病原体的侵入机制。EVs沿着丝状伪足和回缩纤维向细胞体移动, 进入细胞后, 最终进入溶酶体^[52]。EVs摄取与HSPG介导的内吞作用直接相关。研究表明, 低氧环境能够诱导胶质瘤细胞通过HSPG介导的内吞途径, 有效摄取EVs^[53]。整合素β3(ITGβ3)与HSPG的互作协助靶细胞捕获EVs, 并通过内吞作用将其内化; 使用特定的抑制剂或敲除ITGβ3基因后, EVs的摄取显著减少, 这证实了ITGβ3在EVs内吞过程中的关键作用^[54]。

Table 1 The uptake mechanisms and roles of EVs
表1 EV的摄取机制及发挥的作用

EV来源	摄取机制	关键因子	靶细胞	功能	文献
DC	受体-配体结合	MHC、TNF-α、FasL、TRAIL	T淋巴细胞	免疫调节、抗肿瘤作用	[16-17, 19]
DC	膜融合	MFG-E8	肿瘤细胞	抗肿瘤免疫反应	[25-26]
脂肪来源再生细胞	内吞作用	AP-2、AAK1	心肌细胞	提高心肌细胞的抗凋亡	[35]
PC12细胞	内吞作用	网格蛋白	骨髓来源的间充质基质细胞	调节正常细胞中靶基因的表达	[15]
生姜	内吞作用	小窝蛋白	肠上皮细胞	抑制炎症反应	[38]
B细胞	内吞作用	caveolin-1	人上皮细胞	促进靶细胞的表型调节	[37]
胶质母细胞瘤细胞	内吞作用	caveolin-1	人脐静脉内皮细胞	肿瘤血管生成和转移增加	[42]
乳腺肿瘤细胞	内吞作用	AnxA2、AnxA6	乳腺上皮细胞	参与细胞的黏附和生长	[43]
K562、MT4细胞	吞噬作用	PI3K、PLC、Dyn2	巨噬细胞	参与信息的释放或细胞内信号转导的启动	[45]
DC、巨噬细胞	巨胞饮作用	SNX5、SNX9	内皮细胞、上皮细胞等	参与抗原呈递、营养传感、血浆蛋白循环、迁移和信号转导	[47-49]
人表皮样癌细胞	巨胞饮作用	Rac1、PAK1	HeLa细胞	调节炎症	[16]
胶质母细胞瘤细胞	内吞作用	HSPG	肿瘤细胞	缺氧应激的适应性反应, 侵袭性肿瘤通过细胞外脂质清除	[53]
shITGβ3细胞	内吞作用	ITGβ3	乳腺癌细胞	细胞间通讯	[54]

shITGβ3细胞: 指那些通过RNA干扰技术(如短双链RNA、shRNA)特异性地敲低(即减少表达)整合素β3(ITGβ3)的细胞。

2.4 细胞外囊泡内容物的胞内运输

EVs进入受体细胞后, 与内体系统接触融合并将所包裹的内容物释放至胞质中^[3]。GFP融合表达CD3, 并用红色荧光蛋白(mCherry)标记抗体进行共定位研究表明, GFP标记的EVs与细胞膜融合

后进入细胞质, 可以与溶酶体关联膜蛋白1(LAMP1)共定位, 这表明EVs可与细胞核内体及溶酶体融合, 将内容物释放到细胞质中^[55-56]。细胞内体pH值及其胆固醇含量可影响EVs内容物从内体释放到细胞质^[52, 55]。低pH条件下, 肿瘤细胞

EVs的释放水平和摄取能力均显著增加,使用质子泵抑制剂预处理肿瘤细胞,可以抑制EVs的摄取,这表明通过调节细胞内外pH值可以控制EVs在胞内外的运输^[22]。使用溶酶体胆固醇运输抑制剂U18666A处理类胚肾细胞系(HEK293T),造成细胞内体中胆固醇大量积累,可减少细胞内体EVs的释放,进而影响其在细胞内的运输过程^[57]。体内外试验表明,胆固醇对星形胶质细胞EVs的释放具有负向调节作用^[58]。胆固醇对不同EVs胞内运输的作用不同,这可能因细胞类型及其所携带的生物分子不同而不同^[59]。

2.5 细胞外囊泡的体内吸收、分布

EVs可以作用于不同的器官或细胞,但这些器官或细胞对不同来源的EVs的吸收效果也会有所差异。不同细胞来源的EVs可能具有不同的表面分子,这会影响它们与特定细胞或组织的相互作用。通过对比三种鼠源细胞产生的EVs发现,这些EVs均能被肺、肝、脾、胰和胃肠道吸收。其中C2C12-EVs在肝脏聚集最为显著,B16F10-EVs主要在胃肠道分布,而DC-EVs在脾分布最为集中^[60]。EVs在体内的分布与它们的靶向性密切相关。姜黄衍生EVs可用于治疗、缓解结肠炎症。用DiR标记的姜黄衍生EVs灌胃结肠炎小鼠6或24 h,消化道、肠系膜淋巴结和重要器官(心脏、肝脏、脾脏、肺和肾脏)通过IVIS® Spectrum成像系统进行成像,结果显示,DiR信号主要位于消化道^[61]。黄瓜来源的EVs主要分布在肺部,显示出其在治疗肺癌方面的潜在应用^[62]。不同的给药方式也会影响EVs在体内的分布。静脉注射间充质基质细胞衍生的EVs(MSC-EVs)后,它们在肺、肝和脾中累积;而通过气管内给药,MSC-EVs则主要分布在肺部^[63]。同样,通过静脉注射、腹膜内注射和皮下注射给药的HEK-293T EVs,在脑和肝中显示出累积^[64]。EVs的大小和表面特性也会影响它们在体内的分布和细胞的吸收^[65]。通过工程化改造,EVs可以装载特定的蛋白质或RNA,实现对特定器官或细胞的靶向输送药物。这种策略为开发精准医疗提供了新的可能性。尽管EVs具有广泛的生物相容性和较低的免疫原性,但它们并不是可以被所有器官和细胞吸收。EVs的吸收和分布受到多种因素的调控。在实际应用中,通过优化EVs的设计和给药策略,可以提高它们对特定组织、器官的靶向性和吸收效率,从而增强应用

效果。

3 EVs在疾病诊疗中的作用

3.1 细胞外囊泡与疾病诊断

病例组织细胞分泌的EVs通常还有特殊的生物分子,这些生物标志物可用于早期疾病检测、监测疾病进展和评估治疗反应(图3)。EVs作为疾病诊断的生物标志物,其携带的RNA和蛋白质分子为疾病的早期检测、进展监测和治疗效果评估提供了新的途径。

3.1.1 细胞外囊泡中的RNA是重要的疾病诊断标志物

EVs miRNA作为疾病诊断生物标志物的优势在于它们的高灵敏度和特异性,以及在EVs保护下在体液中的稳定性。EVs可用作心脏疾病的诊断标志物,循环系统外泌体ncRNA、miRNA、circRNA均可作为生物标志物用于冠心病、原发性肺动脉高压等心脏疾病的诊断,其灵敏度和特异性均高于心电图^[66]。与健康个体相比,早期结直肠癌患者血清中EVs miR-99b-5p和miR-150-5p的表达水平显著降低,且与患者的肿瘤分期和淋巴结转移情况密切相关。术后可观察到这些miRNA在结直肠癌患者中的表达水平明显升高,这些发现验证了前面的实验结果,进一步支持了这些特定miRNA可以作为结直肠癌的生物标志物^[67-68]。肿瘤相关的成纤维细胞释放的EVs中含有较高水平的miR-21,这些EVs一旦被膀胱癌细胞吸收,miR-21通过靶向并抑制同源磷酸酶张力蛋白来促进膀胱癌细胞的侵袭和转移能力^[69]。在肺癌细胞释放的EVs中,特定的miRNA如miR-23a、miR-21、miR-210和miR-192能够通过促进血管生成和增加血管的通透性,从而加速肺癌的发展^[70]。EVs中的miR-17、miR-19a、miR-21、miR-126和miR-149的水平升高可作为黑色素瘤的生物标志物,用于早期诊断和疾病监测^[71]。miRNA易降解,不同来源的miRNA含量差异过大等因素也影响EVs miRNA作为诊断标记物的推广应用。随着研究的不断深入,新材料、新设备、新技术不断涌现,EVs miRNA有望成为疾病诊断的重要标记物。但EVs miRNA作为临床诊断标记物仍面临诸多挑战,包括标准化的样本收集和处理流程、高通量和高灵敏度的检测技术的开发,以及对EVs miRNA在疾病中作用机制的深入理解。

3.1.2 细胞外囊泡中的特异性蛋白可作为疾病诊断的标志物

EVs存在于各种体液中,可用于监测细胞的状态。因此,EVs是疾病诊断的理想非侵入性生物标志物。卵巢癌来源的EVs中检测到CD47、CD71和CD326表达^[72]。结肠癌的特异性表面标志物CD326在LIM1215细胞及其EVs上均高水平表达^[73]。慢性淋巴细胞白血病患者血液样本及其中的EVs中均表达CD5、CD19、CD21、CD31、

CD37、CD44、CD49c、CD55、CD63、CD82、HLA-DR和HLA-ABC,其中CD5和CD19的共同表达可诊断慢性淋巴细胞白血病^[73-74]。血浆中表达细胞膜相关蛋白CD63和caveolin-1的EVs被认为是黑色素瘤的非侵入性标志物^[75]。未来随着对EVs蛋白质的深入研究,可能会发现更多的EVs相关疾病标志物,为临床诊断和治疗提供更多新的思路和方法。

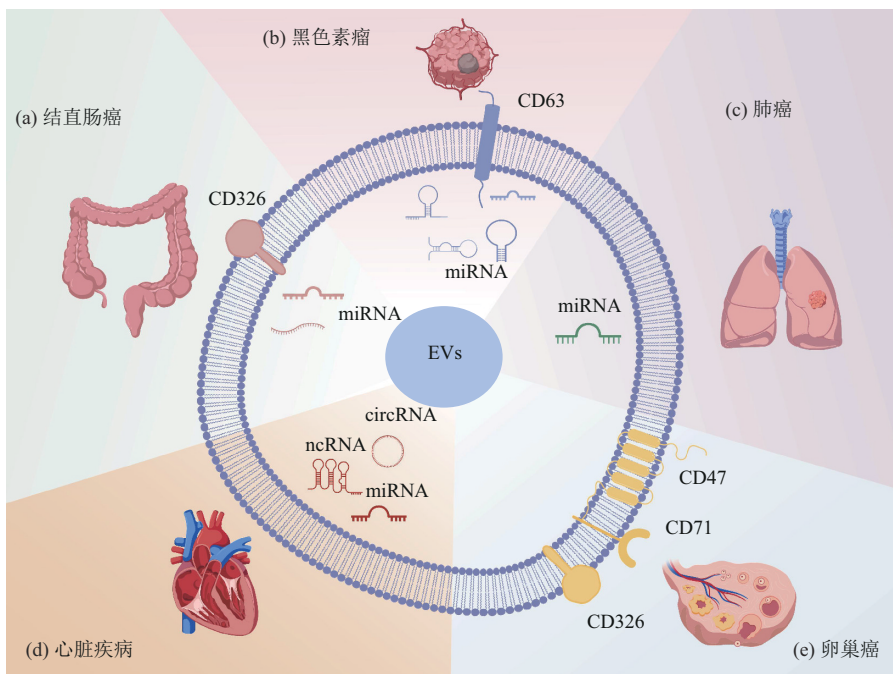


Fig. 3 The application of extracellular vesicles in disease diagnosis (created with gdp.renlab.cn.)

图3 细胞外囊泡在疾病诊断中的应用 (使用gdp.renlab.cn.绘制)

(a) EVs中CD326、miR-99-5p、miR-150-5p的高表达可做为结肠癌的诊断标志物。(b) EVs中CD63、miR-17、miR-19a、miR-21、miR-126、miR-149的高表达量可做为黑色素瘤的诊断标志物。(c) EVs中miRNA高表达量可做为肺癌的诊断标志物。(d) EVs中CD326、miRNA、ncRNA、circRNA的高表达量可做为心脏疾病的诊断标志物。(e) EVs中CD326、CD71、CD47的高表达量可做为卵巢癌的诊断标志物。

3.2 细胞外囊泡与疾病预防和治疗

EVs在疾病预防和治疗方面的作用主要体现在三个方面:疫苗的开发平台、具有作为药物的潜力和药物递送系统。EV的装载方式及其在疾病治疗的作用见表2。

3.2.1 细胞外囊泡可用于新型疫苗开发

在癌症免疫治疗领域,DC衍生的EVs (DEX)和肿瘤来源的EVs被探索作为潜在的疫苗。这些来自成熟DC的DEX通常含有大量的MHC I类和MHC II类分子,共刺激分子、整合素和四跨膜蛋

白,这些分子赋予了DEX免疫调节的特性,包括免疫抑制和抗炎作用,在癌症治疗中具有重要的应用潜力^[76-77]。HIV-1抗原可以装载到EVs中,这种修饰的囊泡可以通过不同的装载方法递送到靶细胞或组织;也有研究探索利用EVs作为载体,将HIV-1抗原和佐剂递送到免疫系统中,以增强疫苗的效果^[78]。病毒细胞释放的EVs还携带病毒miRNA、蛋白质,甚至整个病毒粒子都会调节相邻细胞并影响病毒的免疫识别。从丙型肝炎患者血液中分离出的EVs中含有病毒RNA,这些RNA与

CD81 共同定位, 并能够将病毒 RNA 传递给尚未被感染的细胞, 这一过程可触发 DC 细胞产生天然干扰素的反应, 从而有助于保护未感染的细胞免受病毒感染^[79]。革兰氏阳性菌肺炎链球菌、金黄色葡萄球菌的 EVs 作为潜在疫苗, 也受到广泛关注^[80]。EVs 作为疫苗递送载体具有较高的生物相容性, 通常不会引起宿主的强烈免疫反应或炎症, 但在某些情况下, 它们仍有可能引起免疫反应或副作用。作为一种新型疫苗载体, EVs 可能需要全新的监管和批准流程, 这需要在政策、法规方面的创新突破。

3.2.2 细胞外囊泡具有药物开发潜力

干细胞来源的 EVs 作为药物, 用于多种疾病的治疗。EVs 具有抗炎和免疫调节功能。间充质干细胞的 EVs 中的 miR-223-5p 分子可抑制趋化因子受体 (CCR2) 的激活, 减少炎症因子浸润, 从而减轻心脏缺血再灌注损伤。脂肪间充质干细胞来源的 EVs 能够通过刺激 S1P/SK1/S1PR1 信号通路, 抑制 M2 巨噬细胞的极化, 并减轻心肌组织纤维化, 从而减轻心肌梗死后的心肌损伤^[81]。DC 衍生的 EVs 中 miR-494-3p 分子能够刺激心肌梗死后的血管再生, 从而保护心肌功能^[82-83]。猪间充质干细胞 EVs 来源的 miR-125a-5p 具有较强的心肌保护功能, 该小分子 RNA 能够促进心肌血管再生, 抑制心肌细胞凋亡和炎症反应, 从而促进心肌损伤修复^[84]。EVs 通过抗氧化机制发挥疾病治疗作用。EVs 内的超氧化物歧化酶 (SOD2/SOD3) 可显著降低氧化损伤引起的大鼠心肌细胞凋亡, 从而保护心肌功能^[85]。人脐带间充质干细胞来源的 miR-26a-5p 可通过沉默长链非编码 RNA (MALAT1), 发挥抗氧化作用, 进而抑制小鼠急性肝损伤^[86]。EVs 可调控细胞凋亡过程, 进而发挥疾病治疗作用。在肝损伤后的纤维化过程中, 人造血干细胞来源的 EVs 中的 miRNA-99a-5p 可靶向骨形态发生蛋白受体 2 (BMP2), 诱导细胞凋亡, 从而抑制肝脏纤维化^[87]。EVs 还具有病毒抑制作用。间充质干细胞来源的 EVs 中的 miR-129-5p 可通过靶向 TRAF3, 治疗和预防心衰^[88]。心脏祖细胞来源的 EVs 能够通过 mTOR 信号通路抑制柯萨奇病毒 B3 (CVB3) 诱导的心肌细胞凋亡, 并能够抑制该病毒的增殖^[89]。EVs 作为一种可能的新型药物, 备受业界关注。但由于 EVs 中通常包含 RNA、蛋白质及小分子等多种复杂的成分, 这对其成药性造成较大影响。在充分发挥其活性分子治疗作用的同时, 如何避免其他分子的干扰, 甚至是副作用, 是面临的最

大难题。此外, EVs 的数量极低, 制备流程复杂, 纯化手段单一, 成本高昂。这些都大大限制类 EVs 的成药性。今后, 需要开发大规模生产制备 EVs 的新技术、纯化新方法, 降低其成本。

3.2.3 细胞外囊泡是一种极具潜力的药物递送载体

工程化 EVs 是通过生物工程技术改造的 EVs, 使其能够携带治疗性药物分子, 并能够靶向特定的细胞或组织, 这种靶向性有助于减少药物对正常细胞的副作用, 同时增加对病变细胞的治疗效果^[90-91]。工程化囊泡的药物装载可以通过内源性与外源性方法实现。

内源性方法是指在形成囊泡前, 通过基因工程技术转染供体细胞以表达所需的蛋白质、核酸或药物分子的囊泡。内源性载药的方式在操作上更为复杂且负载率较低。iRGD 是一种肿瘤靶向肽, 能够特异性地结合肿瘤细胞表面的受体, 增强药物的肿瘤靶向性和穿透能力^[92]。利用 iRGD 肽修饰 EVs, 以此作为递送载体将 BCL6 siRNA 直接传递到弥漫性大 B 细胞淋巴瘤 (diffuse large B-cell lymphoma, DLBCL) 中, 从而抑制 BCL6 基因的表达, 有效地减少 DLBCL 细胞的增殖和存活, 抑制肿瘤的生长和进展^[93]。装载了雷公藤内酯 (TPL) 的 TRAIL-EVs 通过体外激活外源性 TRAIL 通路和内源线粒体通路, 可提高 EVs 的靶向性, 抑制黑色素瘤的增殖、侵袭和迁移^[94]。工程化质粒可以用于增强 EVs 的特异性靶向性, 使其更有效地与目标细胞结合和传递内容物。构建 CAP-FLAG-Lamp2b 质粒并将其递送至 DC 中, 通过超速离心从转基因 DC 中分离出携带 CAP-FLAG-Lamp2b 蛋白的 EVs, 这种工程化 EVs 能够选择性地封装和递送 CRISPR/Cas9 质粒到嵌入关节软骨的软骨细胞中, 并减轻软骨损伤的状况^[95]。将编码胶质细胞源性神经营养因子 (glial cell line-derived neurotrophic factor, GDNF) 的质粒转染巨噬细胞中, 转基因巨噬细胞释放出含有 GDNF 的 EVs, 这些改造后的巨噬细胞能够产生显著的神经保护作用^[96]。

外源性方法是在获取天然的 EVs 的基础上, 通过电穿孔法、共孵育法、超声法、化学转染法及反复冻融法将药物装载于 EVs 中^[97]。共孵育法将成骨促进药物甲状旁腺激素 (PTH1-34) 装载入骨髓间充质干细胞来源的 EVs 中, 实验结果显示, 负载 PTH1-34 的 EVs 能够显著促进成骨细胞增殖和分化, 并抑制破骨细胞的形成和功能, 对骨质疏松症具有较好的治疗作用^[98]。紫杉醇可通过共孵育、

电穿孔等方式, 装载进 EVs 中^[99-101]。通过工程化改造 EVs 并利用其天然的细胞间通讯能力, 可以实现对受损血管的靶向治疗, 减少炎症和氧化应激, 促进血管修复, 为动脉粥样硬化的治疗提供了新的可能性^[102]。EVs 作为一种新兴的药物递送工具,

在治疗癌症、神经退行性疾病、肾脏疾病等中显示出潜力。尽管 EVs 作为药物递送系统具有巨大潜力, 但仍面临一些挑战, 包括提高生产规模、优化分离纯化技术、确保 EVs 的均质性和稳定性等。

Table 2 Engineered EVs loading methods and their research findings in disease treatment

表2 工程化EV的装载方式及其在疾病治疗领域的研究成果

EV来源	有效成分	有效成分装载方式	治疗的疾病类型	文献
间充质干细胞	多柔比星	电穿孔	结直肠癌	[103]
单核细胞来源的髓细胞	姜黄素	共孵育	癌症、脑部疾病、心肌梗死	[104-105]
骨髓间充质干细胞	半乳糖凝集素9 siRNA	电穿孔	胰腺癌	[106]
H1299、MRC9细胞	阿霉素	共孵育	增强对癌细胞的选择性抗肿瘤作用	[107]
DC	BCL6 siRNA、TPL、CAP-FLAG-Lamp2b	质粒转染	抑制肿瘤的生长、侵袭和迁移; 治疗软骨损伤	[93-95]
巨噬细胞	GDNF	质粒转染	神经保护作用	[96]
巨噬细胞、前列腺癌细胞、间充质干细胞、生姜	紫杉醇	超声处理、共孵育、电穿孔	抑制肿瘤生长	[99-101, 103, 107]
骨髓间充质干细胞	PTH1-34	共孵育法	骨质疏松症	[98]

H1299: 一种人非小细胞肺癌细胞系; MRC-9: 一种人胚肺细胞系。

4 EVs的分离与纯化技术

常见的 EVs 分离纯化技术主要有: 超速离心、免疫亲和层析、聚合物共沉淀、超滤、尺寸排阻层析和微流体等^[108-109]。其中超速离心是最常用的方法, 又可分为差速超速离心和密度梯度离心。超速离心适用于绝大多数样本, 对样本及试剂的要求不高, 对 EVs 的影响也较小, 但也存在对设备要求高、耗时长、产率低及产物污染等缺点^[110]。免疫亲和法是利用特异性的抗原-抗体反应来分离不同亚型的 EVs, 该方法的特异性较高、分离的 EVs 纯度高、对样本的消耗量小, 但也存在成本高、回收率低、引入洗脱步骤等局限性, 由于该方法依赖于 EVs 表面蛋白与其特异性抗体的反应, 所以不适用于大规模富集 EVs^[111]。聚合物共沉淀是通过使用 PEG 试剂降低 EVs 的溶解度并低速离心来实现的。操作方法简单便捷、回收率较高, 但特异性较低、易造成杂蛋白或纳米颗粒污染, 对后续分析 EVs 的影响较大^[112]。超滤通过使用特定孔径或截留分子质量的膜来分离固定尺寸范围内的颗粒, 适用于体积较大且对纯度有要求的样本, 但也存在耗材昂贵、滤膜易堵塞、操作步骤繁琐耗时、产率低、难以保持 EV 的天然形态的缺点^[113]。尺寸排阻层析 (SEC) 法是利用 EVs 的尺寸特性进行物理过滤的

分离方法, 该方法对 EVs 的形态影响最小、分离的 EVs 纯度高, 但也存在耗时长、回收率低和特异性不够高, 对后续分析造成一定的不利影响^[114-115]。微流控已成为 EVs 分离的新方法之一, 可以根据调节 EVs 隔离过程的性质将它们区分为物理和化学方法^[116]。物理方法是利用 EVs 的大小及密度来区分, 而化学法是基于特异性抗体与抗原之间的结合, 通过固定在芯片上的相应抗体来识别外泌体标志物, 从而富集 EVs^[117]。微流控技术可以分离完整、高产量和高纯度的 EVs, 大大减少实验和过程自动化所需的样品、试剂和时间, 还可用于 EVs 的分析和检测, 但该技术对设备的要求较高, 易造成堵塞, 不适用于大规模分离 EVs。由于单一的分

离技术不足以满足人们对高质量、高纯度 EVs 的需求, 所以通常会用多种方法联合使用对样品进行分离、纯化 EVs。

5 总结与展望

本文重点讨论了 EVs 的生物组成、发生、摄取机制及在疾病诊疗中发挥的作用。EVs 通过受体-配体相互作用、膜融合和内吞作用与靶细胞相互作用, 进而发挥生理活性作用。这些机制可能不是相互独立的, 而是相互作用, 共同影响 EVs 的摄取过程。此外, 不同的细胞类型可能偏好不同的摄取机

制,这取决于细胞的特性和EVs的来源。研究这些机制有助于更好地理解EVs在细胞间通讯中的作用,以及如何利用EVs作为药物递送系统。

EVs作为细胞间通讯的关键介质,在生理和病理过程中介导着重要的角色。它们不仅在疾病的诊断中作为重要的生物标志物发挥作用,还因其独特的生物学特性,被视作新型药物和药物递送系统的有希望的候选者,展现出在人类疾病预防和治疗中的广阔应用前景。近年来,关于EVs在疾病监测、药物载体开发和靶向治疗等方面的研究取得了显著进展。EVs广泛分布于血液、尿液、唾液等多种体液中,为疾病诊断提供了丰富的无创或微创检测材料。它们携带的蛋白质、核酸、脂质等生物分子,为多维度疾病诊断提供了信息,而特定EVs亚群的组织或疾病特异性有助于提升诊断的精确度,促进了早期诊断和治疗的可能性。尽管EVs在疾病诊断领域具有巨大潜力,但仍面临一些挑战。目前,EVs的分离和检测缺乏统一的标准,可能导致不同实验室间结果存在差异。此外,一些EVs检测技术的高成本也可能限制了它们的普及应用。EVs的易污染性要求在样本处理和纯化过程中采取严格的措施,以确保检测结果的可靠性。因此,为了实现EVs在临床上的广泛应用,需要进一步的研究来克服这些技术障碍和标准化挑战。与传统药物递送系统相比,EVs具有安全性高、靶向精准、药物承载能力强和生物相容性好等优势。EVs的天然特性使它们在体内稳定,不易被免疫系统清除,从而提高药物的稳定性和利用率。EVs在低温下稳定,便于存储和运输,能够提升治疗效果,减少副作用,并实现多种药物的联合递送。然而,EVs在药物递送中也面临挑战,包括生产量低、药物装载效率低和分离纯化技术的限制。目前的分离纯化方法不适合大规模生产,且现有的载药方式可能破坏EVs结构,限制了其天然载药能力。对于大分子药物,则需要通过工程化手段提升EVs的载药效率。EVs在药物递送领域具有显著的优势,但仍需解决一些技术和生产上的挑战,以实现其在临床治疗中的广泛应用。

我们发现,植物源性EVs和细菌来源的EVs都显示出作为治疗剂的潜力,尤其是在调节肠道免疫反应和促进肠道屏障功能方面。这些EVs通过调节肠巨噬细胞的功能、调节肠道免疫环境的内稳态以及塑造肠道微生物群,从而改善结肠炎。但它们在临床应用仍处于研究阶段,需要更多的临床验证研

究来确保安全性和有效性。

本文总结出仍需深入研究的几个关键科学问题:a.不同类型细胞摄取EVs的确切机制;b. EVs的内容物在胞内的作用路线;c.大规模分离、纯化EVs的技术以及检验标准;d. EVs在疾病诊疗中的安全性及用于临床的可行性。今后,需综合生命科学、信息、数据、化学、材料等多学科力量,开展跨学科、跨行业协同技术攻关,全面揭示EVs产生、分泌、转运和摄取的机制,解析其活性分子组成及作用机制,为诊断新技术、新产品和新药开发提供支撑。

参 考 文 献

- [1] Doyle L M, Wang M Z. Overview of extracellular vesicles, their origin, composition, purpose, and methods for exosome isolation and analysis. *Cells*, 2019, **8**(7): 727
- [2] Cheng L, Hill A F. Therapeutically harnessing extracellular vesicles. *Nat Rev Drug Discov*, 2022, **21**(5): 379-399
- [3] Popa S J, Stewart S E. Socially distanced intercellular communication: mechanisms for extracellular vesicle cargo delivery. *Subcell Biochem*, 2021, **97**: 179-209
- [4] Patil S M, Sawant S S, Kunda N K. Exosomes as drug delivery systems: a brief overview and progress update. *Eur J Pharm Biopharm*, 2020, **154**: 259-269
- [5] O'Brien K, Breyne K, Ughetto S, *et al.* RNA delivery by extracellular vesicles in mammalian cells and its applications. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2020, **21**(10): 585-606
- [6] Niu G, Jian T, Gai Y, *et al.* Microbiota and plant-derived vesicles that serve as therapeutic agents and delivery carriers to regulate metabolic syndrome. *Adv Drug Deliv Rev*, 2023, **196**: 114774
- [7] Zhao X, Wu D, Ma X, *et al.* Exosomes as drug carriers for cancer therapy and challenges regarding exosome uptake. *Biomedecine Pharmacother*, 2020, **128**: 110237
- [8] Li X, Bao H, Wang Z, *et al.* Biogenesis and function of multivesicular bodies in plant immunity. *Front Plant Sci*, 2018, **9**: 979
- [9] Stoorvogel W, Kleijmeer M J, Geuze H J, *et al.* The biogenesis and functions of exosomes. *Traffic*, 2002, **3**(5): 321-330
- [10] Kalluri R, LeBleu V S. The biology, function, and biomedical applications of exosomes. *Science*, 2020, **367**(6478): eaau6977
- [11] 王云溪,陈宁.外泌体及其在心血管疾病发生发展中的作用研究进展. *中国医学创新*, 2020, **17**(13): 156-159
Wang Y X, Chen N. *Med Innov China*, 2020, **17**(13): 156-159
- [12] Segura E, Guérin C, Hogg N, *et al.* CD8⁺ dendritic cells use LFA-1 to capture MHC-peptide complexes from exosomes *in vivo*. *J Immunol*, 2007, **179**(3): 1489-1496
- [13] Montealegre S, van Endert P M. Endocytic recycling of MHC class I molecules in non-professional antigen presenting and dendritic cells. *Front Immunol*, 2019, **9**: 3098
- [14] Morelli A E, Larregina A T, Shufesky W J, *et al.* Endocytosis,

- intracellular sorting, and processing of exosomes by dendritic cells. *Blood*, 2004, **104**(10): 3257-3266
- [15] Tian T, Zhu Y L, Zhou Y Y, *et al.* Exosome uptake through clathrin-mediated endocytosis and macropinocytosis and mediating miR-21 delivery. *J Biol Chem*, 2014, **289**(32): 22258-22267
- [16] Costa Verdera H, Gitz-Francois J J, Schiffelers R M, *et al.* Cellular uptake of extracellular vesicles is mediated by clathrin-independent endocytosis and macropinocytosis. *J Control Release*, 2017, **266**: 100-108
- [17] Hwang J R, Byeon Y, Kim D, *et al.* Recent insights of T cell receptor-mediated signaling pathways for T cell activation and development. *Exp Mol Med*, 2020, **52**(5): 750-761
- [18] Guan S, Li Q, Liu P, *et al.* Umbilical cord blood-derived dendritic cells loaded with BGC823 tumor antigens and DC-derived exosomes stimulate efficient cytotoxic T-lymphocyte responses and antitumor immunity *in vitro* and *in vivo*. *Cent Eur J Immunol*, 2014, **39**(2): 142-151
- [19] Sobo-Vujanovic A, Munich S, Vujanovic N L. Dendritic-cell exosomes cross-present Toll-like receptor-ligands and activate bystander dendritic cells. *Cell Immunol*, 2014, **289**(1/2): 119-127
- [20] Pegtel D M, Gould S J. Exosomes. *Annu Rev Biochem*, 2019, **88**: 487-514
- [21] Jahn R, Südhof T C. Membrane fusion and exocytosis. *Annu Rev Biochem*, 1999, **68**: 863-911
- [22] Parolini I, Federici C, Raggi C, *et al.* Microenvironmental pH is a key factor for exosome traffic in tumor cells. *J Biol Chem*, 2009, **284**(49): 34211-34222
- [23] Gowda R, Robertson B M, Iyer S, *et al.* The role of exosomes in metastasis and progression of melanoma. *Cancer Treat Rev*, 2020, **85**: 101975
- [24] Bonsergent E, Grisard E, Buchrieser J, *et al.* Quantitative characterization of extracellular vesicle uptake and content delivery within mammalian cells. *Nat Commun*, 2021, **12**(1): 1864
- [25] Théry C, Regnault A, Garin J, *et al.* Molecular characterization of dendritic cell-derived exosomes. Selective accumulation of the heat shock protein hsc73. *J Cell Biol*, 1999, **147**(3): 599-610
- [26] Lau N C H, Yam J W P. From exosome biogenesis to absorption: key takeaways for cancer research. *Cancers*, 2023, **15**(7): 1992
- [27] Zheng Y, Tu C, Zhang J, *et al.* Inhibition of multiple myeloma-derived exosomes uptake suppresses the functional response in bone marrow stromal cell. *Int J Oncol*, 2019, **54**(3): 1061-1070
- [28] Montecalvo A, Larregina A T, Shufesky W J, *et al.* Mechanism of transfer of functional microRNAs between mouse dendritic cells *via* exosomes. *Blood*, 2012, **119**(3): 756-766
- [29] Chen C, Cai N, Niu Q, *et al.* Quantitative assessment of lipophilic membrane dye-based labelling of extracellular vesicles by nano-flow cytometry. *J Extracell Vesicles*, 2023, **12**(8): e12351
- [30] Gurung S, Perocheau D, Touramanidou L, *et al.* The exosome journey: from biogenesis to uptake and intracellular signalling. *Cell Commun Signal*, 2021, **19**(1): 47
- [31] van Niel G, Carter D R F, Clayton A, *et al.* Challenges and directions in studying cell-cell communication by extracellular vesicles. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2022, **23**(5): 369-382
- [32] Murphy D E, de Jong O G, Brouwer M, *et al.* Extracellular vesicle-based therapeutics: natural versus engineered targeting and trafficking. *Exp Mol Med*, 2019, **51**(3): 1-12
- [33] Mulcahy L A, Pink R C, Carter D R F. Routes and mechanisms of extracellular vesicle uptake. *J Extracell Vesicles*, 2014, **3**: 3
- [34] Morishita M, Horita M, Higuchi A, *et al.* Characterizing different probiotic-derived extracellular vesicles as a novel adjuvant for immunotherapy. *Mol Pharm*, 2021, **18**(3): 1080-1092
- [35] Eguchi S, Takefuji M, Sakaguchi T, *et al.* Cardiomyocytes capture stem cell-derived, anti-apoptotic microRNA-214 *via* clathrin-mediated endocytosis in acute myocardial infarction. *J Biol Chem*, 2019, **294**(31): 11665-11674
- [36] Gandek T B, van der Koog L, Nagelkerke A. A comparison of cellular uptake mechanisms, delivery efficacy, and intracellular fate between liposomes and extracellular vesicles. *Adv Healthc Mater*, 2023, **12**(25): e2300319
- [37] Nanbo A, Kawanishi E, Yoshida R, *et al.* Exosomes derived from Epstein-Barr virus-infected cells are internalized *via* caveola-dependent endocytosis and promote phenotypic modulation in target cells. *J Virol*, 2013, **87**(18): 10334-10347
- [38] Yin L, Yan L, Yu Q, *et al.* Characterization of the microRNA profile of ginger exosome-like nanoparticles and their anti-inflammatory effects in intestinal caco-2 cells. *J Agric Food Chem*, 2022, **70**(15): 4725-4734
- [39] Diaz-Rohrer B, Levental K R, Levental I. Rafting through traffic: membrane domains in cellular logistics. *Biochim Biophys Acta*, 2014, **1838**(12): 3003-3013
- [40] Liu Y J, Wang C. A review of the regulatory mechanisms of extracellular vesicles-mediated intercellular communication. *Cell Commun Signal*, 2023, **21**(1): 77
- [41] Horibe S, Tanahashi T, Kawauchi S, *et al.* Mechanism of recipient cell-dependent differences in exosome uptake. *BMC Cancer*, 2018, **18**(1): 47
- [42] Svensson K J, Christianson H C, Wittrup A, *et al.* Exosome uptake depends on ERK1/2-heat shock protein 27 signaling and lipid Raft-mediated endocytosis negatively regulated by caveolin-1. *J Biol Chem*, 2013, **288**(24): 17713-17724
- [43] Koumangoye R B, Sakwe A M, Goodwin J S, *et al.* Detachment of breast tumor cells induces rapid secretion of exosomes which subsequently mediate cellular adhesion and spreading. *PLoS One*, 2011, **6**(9): e24234
- [44] Ginini L, Billan S, Fridman E, *et al.* Insight into extracellular vesicle-cell communication: from cell recognition to intracellular fate. *Cells*, 2022, **11**(9): 1375
- [45] Feng D, Zhao W L, Ye Y Y, *et al.* Cellular internalization of exosomes occurs through phagocytosis. *Traffic*, 2010, **11**(5): 675-687
- [46] Cheng Z, Wang L, Wu C, *et al.* Tumor-derived exosomes induced M2 macrophage polarization and promoted the metastasis of osteosarcoma cells through tim-3. *Arch Med Res*, 2021, **52**(2): 200-210

- [47] Sandvig K, Kavaliauskiene S, Skotland T. Clathrin-independent endocytosis: an increasing degree of complexity. *Histochem Cell Biol*, 2018, **150**(2): 107-118
- [48] Lin X P, Mintern J D, Gleeson P A. Macropinocytosis in different cell types: similarities and differences. *Membranes*, 2020, **10**(8): 177
- [49] Varma S, Dey S, Palanisamy D. Cellular uptake pathways of nanoparticles: process of endocytosis and factors affecting their fate. *Curr Pharm Biotechnol*, 2022, **23**(5): 679-706
- [50] Fitzner D, Schnaars M, van Rossum D, *et al.* Selective transfer of exosomes from oligodendrocytes to microglia by macropinocytosis. *J Cell Sci*, 2011, **124**(Pt 3): 447-458
- [51] Lin H P, Singla B, Ghoshal P, *et al.* Identification of novel macropinocytosis inhibitors using a rational screen of Food and Drug Administration-approved drugs. *Br J Pharmacol*, 2018, **175**(18): 3640-3655
- [52] Heusermann W, Hean J, Trojer D, *et al.* Exosomes surf on filopodia to enter cells at endocytic hot spots, traffic within endosomes, and are targeted to the ER. *J Cell Biol*, 2016, **213**(2): 173-184
- [53] Cerezo-Magaña M, Christianson H C, van Kuppevelt T H, *et al.* Hypoxic induction of exosome uptake through proteoglycan-dependent endocytosis fuels the lipid droplet phenotype in glioma. *Mol Cancer Res*, 2021, **19**(3): 528-540
- [54] Fuentes P, Sesé M, Guijarro P J, *et al.* ITGB3-mediated uptake of small extracellular vesicles facilitates intercellular communication in breast cancer cells. *Nat Commun*, 2020, **11**(1): 4261
- [55] Joshi B S, de Beer M A, Giepmans B N G, *et al.* Endocytosis of extracellular vesicles and release of their cargo from endosomes. *ACS Nano*, 2020, **14**(4): 4444-4455
- [56] Silva A M, Lázaro-Ibáñez E, Gunnarsson A, *et al.* Quantification of protein cargo loading into engineered extracellular vesicles at single-vesicle and single-molecule resolution. *J Extracell Vesicles*, 2021, **10**(10): e12130
- [57] Albacete-Albacete L, Navarro-Lérica I, López J A, *et al.* ECM deposition is driven by caveolin-1-dependent regulation of exosomal biogenesis and cargo sorting. *J Cell Biol*, 2020, **219**(11): e202006178
- [58] Abdullah M, Nakamura T, Ferdous T, *et al.* Cholesterol regulates exosome release in cultured astrocytes. *Front Immunol*, 2021, **12**: 722581
- [59] Han Q F, Li W J, Hu K S, *et al.* Exosome biogenesis: machinery, regulation, and therapeutic implications in cancer. *Mol Cancer*, 2022, **21**(1): 207
- [60] Wiklander O P B, Nordin J Z, O'Loughlin A, *et al.* Extracellular vesicle *in vivo* biodistribution is determined by cell source, route of administration and targeting. *J Extracell Vesicles*, 2015, **4**: 26316
- [61] Liu C, Yan X, Zhang Y, *et al.* Oral administration of turmeric-derived exosome-like nanovesicles with anti-inflammatory and pro-resolving bioactions for murine colitis therapy. *J Nanobiotechnology*, 2022, **20**(1): 206
- [62] Chen T, Ma B, Lu S, *et al.* Cucumber-derived nanovesicles containing cucurbitacin B for non-small cell lung cancer therapy. *Int J Nanomedicine*, 2022, **17**: 3583-3599
- [63] Tolomeo A M, Zuccolotto G, Malvicini R, *et al.* Biodistribution of intratracheal, intranasal, and intravenous injections of human mesenchymal stromal cell-derived extracellular vesicles in a mouse model for drug delivery studies. *Pharmaceutics*, 2023, **15**(2): 548
- [64] Gupta D, Liang X, Pavlova S, *et al.* Quantification of extracellular vesicles *in vitro* and *in vivo* using sensitive bioluminescence imaging. *J Extracell Vesicles*, 2020, **9**(1): 1800222
- [65] de Abreu R C, Fernandes H, da Costa Martins P A, *et al.* Native and bioengineered extracellular vesicles for cardiovascular therapeutics. *Nat Rev Cardiol*, 2020, **17**(11): 685-697
- [66] Li N, Zhang T, Zhu L, *et al.* Recent advances of using exosomes as diagnostic markers and targeting carriers for cardiovascular disease. *Mol Pharm*, 2023, **20**(9): 4354-4372
- [67] Zhao Y J, Song X, Niu L, *et al.* Circulating exosomal miR-150-5p and miR-99b-5p as diagnostic biomarkers for colorectal cancer. *Front Oncol*, 2019, **9**: 1129
- [68] Ostenfeld M S, Jensen S G, Jeppesen D K, *et al.* miRNA profiling of circulating EpCAM(+) extracellular vesicles: promising biomarkers of colorectal cancer. *J Extracell Vesicles*, 2016, **5**: 31488
- [69] 魏勇, 陈鹏, 朱洪儒, 等. 肿瘤成纤维细胞通过外泌体 miR-21 促进膀胱癌细胞侵袭转移. *江苏大学学报: 医学版*, 2021, **31**(4): 321-325, 332
Wei Y, Chen P, Zhu H R, *et al.* *J Jiangsu Univ Med Ed*, 2021, **31**(4): 321-325, 332
- [70] Li M Y, Liu L Z, Dong M. Progress on pivotal role and application of exosome in lung cancer carcinogenesis, diagnosis, therapy and prognosis. *Mol Cancer*, 2021, **20**(1): 22
- [71] Karami Fath M, Azargoonjahromi A, Jafari N, *et al.* Exosome application in tumorigenesis: diagnosis and treatment of melanoma. *Med Oncol*, 2022, **39**(2): 19
- [72] Zaborowski M P, Lee K, Na Y J, *et al.* Methods for systematic identification of membrane proteins for specific capture of cancer-derived extracellular vesicles. *Cell Rep*, 2019, **27**(1): 255-268.e6
- [73] Belov L, Matic K J, Hallal S, *et al.* Extensive surface protein profiles of extracellular vesicles from cancer cells may provide diagnostic signatures from blood samples. *J Extracell Vesicles*, 2016, **5**: 25355
- [74] Molica S, Mauro F R, Giannarelli D, *et al.* Differentiating chronic lymphocytic leukemia from monoclonal B-lymphocytosis according to clinical outcome: on behalf of the GIMEMA chronic lymphoproliferative diseases working group. *Haematologica*, 2011, **96**(2): 277-283
- [75] He C, Zheng S, Luo Y, *et al.* Exosome theranostics: biology and translational medicine. *Theranostics*, 2018, **8**(1): 237-255
- [76] Negahdaripour M, Vakili B, Nezafat N. Exosome-based vaccines and their position in next generation vaccines. *Int Immunopharmacol*, 2022, **113**(Pt A): 109265
- [77] Xia J, Miao Y, Wang X, *et al.* Recent progress of dendritic cell-

- derived exosomes (Dex) as an anti-cancer nanovaccine. *Biomedicine Pharmacother*, 2022, **152**: 113250
- [78] Khalid K, Padda J, Khedr A, *et al.* HIV and messenger RNA (mRNA) vaccine. *Cureus*, 2021, **13**(7): e16197
- [79] Huda M N, Nurunnabi M. Potential application of exosomes in vaccine development and delivery. *Pharm Res*, 2022, **39**(11): 2635-2671
- [80] Santos P, Almeida F. Exosome-based vaccines: history, current state, and clinical trials. *Front Immunol*, 2021, **12**: 711565
- [81] Li J, Zhang Q, Jiao H. LncRNA NRON promotes M2 macrophage polarization and alleviates atrial fibrosis through suppressing exosomal miR-23a derived from atrial myocytes. *J Formos Med Assoc*, 2021, **120**(7): 1512-1519
- [82] Wen H, Peng L, Chen Y. The effect of immune cell-derived exosomes in the cardiac tissue repair after myocardial infarction: molecular mechanisms and pre-clinical evidence. *J Cell Mol Med*, 2021, **25**(14): 6500-6510
- [83] Liu H, Zhang Y, Yuan J, *et al.* Dendritic cell-derived exosomal miR-494-3p promotes angiogenesis following myocardial infarction. *Int J Mol Med*, 2021, **47**(1): 315-325
- [84] Li S, Yang K, Cao W, *et al.* Tanshinone IIA enhances the therapeutic efficacy of mesenchymal stem cells derived exosomes in myocardial ischemia/reperfusion injury via up-regulating miR-223-5p. *J Control Release*, 2023, **358**: 13-26
- [85] Liu D, Gu G, Gan L, *et al.* Identification of a CTRP9 C-Terminal polypeptide capable of enhancing bone-derived mesenchymal stem cell cardioprotection through promoting angiogenic exosome production. *Redox Biol*, 2021, **41**: 101929
- [86] Cai J, Tang D, Hao X, *et al.* Mesenchymal stem cell-derived exosome alleviates sepsis-associated acute liver injury by suppressing MALAT1 through microRNA-26a-5p: an innovative immunopharmacological intervention and therapeutic approach for sepsis. *Front Immunol*, 2023, **14**: 1157793
- [87] Li F, Yan T, Wang S, *et al.* Exosome-associated miRNA-99a-5p targeting BMPR2 promotes hepatocyte apoptosis during the process of hepatic fibrosis. *Clin Exp Med*, 2023, **23**(7): 4021-4031
- [88] Yan F, Cui W, Chen Z. Mesenchymal stem cell-derived exosome-loaded microRNA-129-5p inhibits TRAF3 expression to alleviate apoptosis and oxidative stress in heart failure. *Cardiovasc Toxicol*, 2022, **22**(7): 631-645
- [89] An Z, Tian J, Liu Y, *et al.* Exosomes as a cell-free therapy for myocardial injury following acute myocardial infarction or ischemic reperfusion. *Aging Dis*, 2022, **13**(6): 1770-1786
- [90] Sadeghi S, Tehrani F R, Tahmasebi S, *et al.* Exosome engineering in cell therapy and drug delivery. *Inflammopharmacology*, 2023, **31**(1): 145-169
- [91] Liang Y, Duan L, Lu J, *et al.* Engineering exosomes for targeted drug delivery. *Theranostics*, 2021, **11**(7): 3183-3195
- [92] Saifi M A, Sathish G, Bazaz M R, *et al.* Exploration of tumor penetrating peptide iRGD as a potential strategy to enhance tumor penetration of cancer nanotherapeutics. *Biochim Biophys Acta Rev Cancer*, 2023, **1878**(3): 188895
- [93] Liu Q, Dai G, Wu Y, *et al.* iRGD-modified exosomes-delivered BCL6 siRNA inhibit the progression of diffuse large B-cell lymphoma. *Front Oncol*, 2022, **12**: 822805
- [94] Jiang L, Gu Y, Du Y, *et al.* Engineering exosomes endowed with targeted delivery of triptolide for malignant melanoma therapy. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2021, **13**(36): 42411-42428
- [95] Liang Y, Xu X, Xu L, *et al.* Chondrocyte-specific genomic editing enabled by hybrid exosomes for osteoarthritis treatment. *Theranostics*, 2022, **12**(11): 4866-4878
- [96] Zhao Y, Haney M J, Gupta R, *et al.* GDNF-transfected macrophages produce potent neuroprotective effects in Parkinson's disease mouse model. *PLoS One*, 2014, **9**(9): e106867
- [97] 文武龙, 张炜烨, 张筠昊, 等. 外泌体载药系统的研究进展. *中国药房*, 2023, **34**(10): 1271-1275
Wen W L, Zhang W Y, Zhang J H, *et al.* *China Pharm*, 2023, **34**(10): 1271-1275
- [98] 段克友. 负载 PTH1-34 的 BMSCs 源性外泌体在骨质疏松症治疗中的实验研究[D]. 蚌埠: 蚌埠医学院, 2022
Duan K Y. Experimental Study on BMSCs-derived Exosomes Loaded With PTH1-34 in The Treatment of Osteoporosis[D]. Bengbu: Bengbu Medical College, 2022
- [99] 刘洋. 生姜外泌体装载紫杉醇制剂研究及其体外抗肿瘤活性[D]. 济南: 山东大学, 2022
Liu Y. Study on Loading Paclitaxel Preparation into Ginger Exosomes and Its Antitumor Activity *in vitro*[D]. Jinan: Shandong University, 2022
- [100] Chen J, Cao F, Cao Y, *et al.* Targeted therapy of lung adenocarcinoma by the nanoplatform based on milk exosomes loaded with paclitaxel. *J Biomed Nanotechnol*, 2022, **18**(4): 1075-1083
- [101] 夏黎明, 周杨, 乔东方. 天然杀伤细胞来源外泌体运载紫杉醇的抗肿瘤作用研究. *中国临床药理学杂志*, 2021, **37**(23): 3236-3239
Xia L M, Zhou Y, Qiao D F. *Chin J Clin Pharmacol*, 2021, **37**(23): 3236-3239
- [102] Heo J, Kang H. Exosome-based treatment for atherosclerosis. *Int J Mol Sci*, 2022, **23**(2): 1002
- [103] Bakrania A K, Variya B C, Patel S S. Novel targets for paclitaxel nano formulations: hopes and hypes in triple negative breast cancer. *Pharmacol Res*, 2016, **111**: 577-591
- [104] 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. *Mol Ther*, 2010, **18**(9): 1606-1614
- [105] Oskouie M N, Aghili Moghaddam N S, Butler A E, *et al.* Therapeutic use of curcumin-encapsulated and curcumin-primed exosomes. *J Cell Physiol*, 2019, **234**(6): 8182-8191
- [106] Zhou W, Zhou Y, Chen X, *et al.* Pancreatic cancer-targeting exosomes for enhancing immunotherapy and reprogramming tumor microenvironment. *Biomaterials*, 2021, **268**: 120546
- [107] Melzer C, Rehn V, Yang Y, *et al.* Taxol-loaded MSC-derived exosomes provide a therapeutic vehicle to target metastatic breast

- cancer and other carcinoma cells. *Cancers: Basel*, 2019, **11**(6): E798
- [108] 安泰学, 郑磊. 细胞外囊泡的分析方法及临床应用进展. *南方医科大学学报*, 2017, **37**(11): 1559-1563
- An T X, Zheng L. *J South Med Univ*, 2017, **37**(11): 1559-1563
- [109] Chen M, Li J, Lin Y, *et al.* Recent research on material-based methods for isolation of extracellular vesicles. *Anal Methods*, 2024, **16**(20): 3179-3191
- [110] Konoshenko M Y, Lekchnov E A, Vlassov A V, *et al.* Isolation of extracellular vesicles: general methodologies and latest trends. *Biomed Res Int*, 2018, **2018**: 8545347
- [111] Cheng S, Li Y, Yan H, *et al.* Advances in microfluidic extracellular vesicle analysis for cancer diagnostics. *Lab Chip*, 2021, **21**(17): 3219-3243
- [112] Chen J, Li P, Zhang T, *et al.* Review on strategies and technologies for exosome isolation and purification. *Front Bioeng Biotechnol*, 2021, **9**: 811971
- [113] Liu W Z, Ma Z J, Kang X W. Current status and outlook of advances in exosome isolation. *Anal Bioanal Chem*, 2022, **414**(24): 7123-7141
- [114] Liu D S K, Upton F M, Rees E, *et al.* Size-exclusion chromatography as a technique for the investigation of novel extracellular vesicles in cancer. *Cancers*, 2020, **12**(11): 3156
- [115] Kaddour H, Tranquille M, Okeoma C M. The past, the present, and the future of the size exclusion chromatography in extracellular vesicles separation. *Viruses*, 2021, **13**(11): 2272
- [116] Meggiolaro A, Moccia V, Brun P, *et al.* Microfluidic strategies for extracellular vesicle isolation: towards clinical applications. *Biosensors*, 2022, **13**(1): 50
- [117] Yang D, Zhang W, Zhang H, *et al.* Progress, opportunity, and perspective on exosome isolation - efforts for efficient exosome-based theranostics. *Theranostics*, 2020, **10**(8): 3684-3707

The Uptake Mechanisms of Extracellular Vesicles by Target Cells and Their Applications in Disease Diagnosis and Treatment*

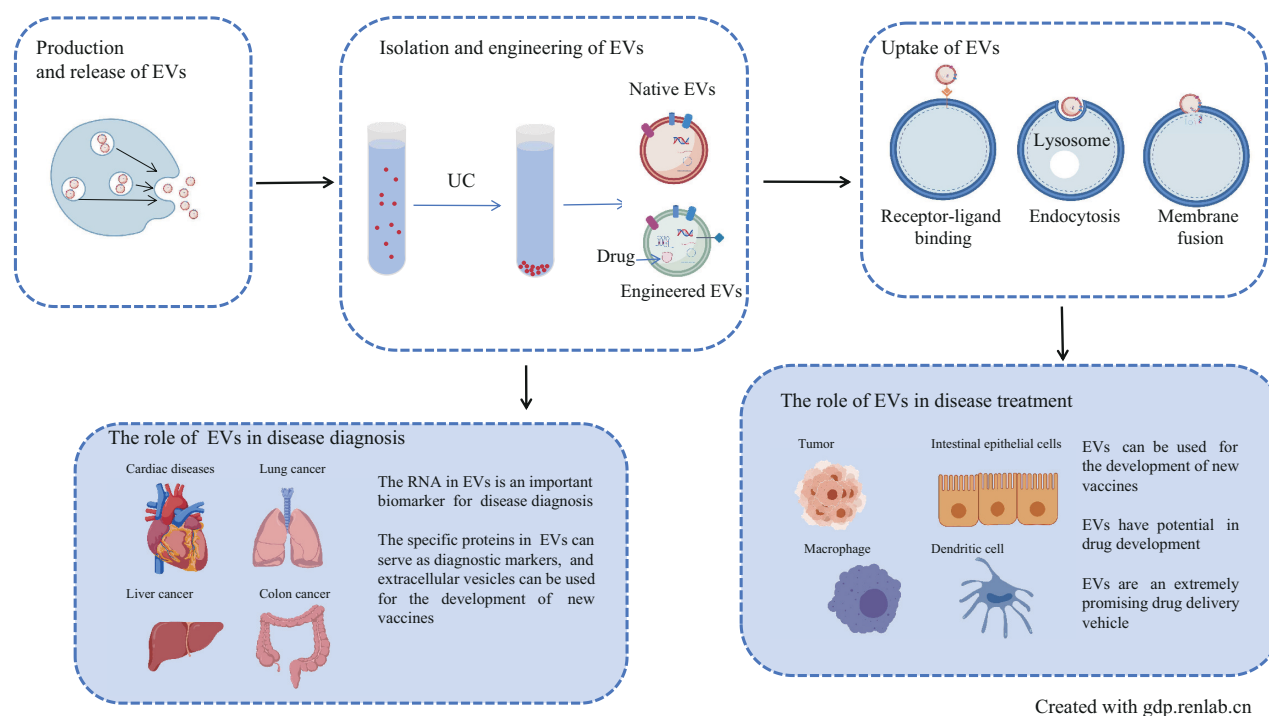
HUANG Ning-Ning¹⁾, QI Li-Li^{2)**}, WANG Jin-Bo²⁾, WANG Meng-Ting²⁾, WU Yu-Qin³⁾

¹⁾College of Life Sciences and Medicine, Zhejiang Sci-Tech University, Hangzhou 310018, China;

²⁾School of Biological and Chemical Engineering, NingboTech University, Ningbo 315100, China;

³⁾Lifestyle Medical Clinic Zhejiang Xinhua Hospital, Hangzhou 310005, China)

Graphical abstract



Abstract Extracellular vesicles (EVs) are nanoscale vesicles secreted by cells and play a pivotal role in intercellular communication. As crucial mediators in cell-to-cell signaling, EVs are instrumental in physiological and pathological processes. They serve not only as significant biomarkers in disease diagnosis but also hold promise as new drug and drug delivery system candidates due to their unique biological properties. The process begins with the cell membrane invagination to form a cup-like structure, selectively encapsulating surface proteins

* This work was supported by grants from National Key R&D Program (2022YFD1300301), Ningbo Municipal Major Science and Technology Tackling Project and “Top Talent” Program (2021Z112, 2018B10095), Ningbo Municipal Science and Technology Special Envoy Program (2022S225), and Ningbo Municipal Natural Science Foundation Project (2023J270).

** Corresponding author.

Tel: 86-13957858287, E-mail: qll@nbt.edu.cn

Received: April 16, 2024 Accepted: June 20, 2024

and soluble proteins to create early endosomes. Under the influence of the endosomal sorting complex required for transport (ESCRT), Rab-GTPase, and tetraspanins, these early endosomes evolve into late sorting endosomes, which form multivesicular bodies. Upon fusion with the plasma membrane, these bodies release EVs into the extracellular space. EVs are internalized by target cells through ligand-receptor interactions, endocytosis, and membrane fusion, thereby executing biological functions. Endocytosis is a common uptake mechanism for EVs, with various pathways including clathrin-dependent pathways, caveolae-mediated uptake, macropinocytosis, phagocytosis, and lipid raft-mediated internalization. Once inside the recipient cell, EVs interact with the endosomal system, fuse, and release their contents into the cytoplasm. The absorption and distribution of EVs in the body are influenced by factors such as their origin, targeting, administration method, size, and surface characteristics. Through engineering, EVs can be loaded with specific proteins or RNA to achieve targeted drug delivery to specific organs or cells. In terms of disease diagnosis, the components of EVs can serve as biomarkers, offering new avenues for early detection, progression monitoring, and therapeutic efficacy assessment. They carry RNA and protein molecules that can reveal pathological changes in their originating cells. In terms of disease treatment, EVs have the potential for targeted delivery, serving as platforms for vaccine development and as drug delivery systems to transport drugs directly to specific cells or tissues. Moreover, EVs themselves can be used as therapeutic agents for autoimmune diseases and cancer. In the realm of EV separation and purification technology, common methods include ultracentrifugation, immunoaffinity chromatography, polymer co-precipitation, ultrafiltration, size exclusion chromatography, and microfluidics. However, due to the limitations of a single separation technique in meeting the demand for high-quality and high-purity EVs, multiple methods are often combined to separate and purify EVs effectively. This article concludes by summarizing the broad application prospects of EVs in the prevention and treatment of human diseases and highlights several key scientific questions that require further in-depth research. The potential of EVs in diagnostics and therapeutics, as well as the challenges in their isolation and characterization, underscores the need for continued exploration and innovation in this field.

Key words extracellular vesicles, uptake mechanisms, disease diagnosis, disease treatment

DOI: 10.16476/j.pibb.2024.0156