论著·基础医学

通过系统性阳离子材料筛选优化牛奶外泌体载体以实现mRNA的高效肺部靶向递送

罗明星[1],廖 睿[1],关 山[1],张卫军[1],罗 萍[1],张 怡[1],程 平[1],李 飏[2],邹全明[1] 陆军军医大学(第三军医大学):[1]药学与检验医学系,[2]第一附属医院药剂科,重庆

[**摘要**] **目的** 通过系统性筛选阳离子修饰材料,旨在构建一种工程化的牛奶来源外泌体(milk-derived exosome, mExos)载体,以实现信使核糖核酸(messenger RNA, mRNA)在呼吸道内的高效递送。**方法** 采用超速离心法提取mExos,并通过电穿孔法将体外转录的萤火虫荧光素酶(firefly luciferase, Fluc)或增强型绿色荧光蛋白(enhanced green fluorescent protein, EGFP)mRNA负载于mExos中。使用壳聚糖(chitosan, CS)、聚乙烯亚胺(polyethylenimine, PEI)、聚(β-氨基酯)[poly (β-amino ester), PBAE]、阳离子脂质(1,2-dioleoyl-3-trimethylammonium-propane chloride, DOTAP)及鱼精蛋白分别对负载mRNA的mExos进行修饰。采用动态光散射、纳米颗粒追踪分析、流式细胞术、荧光素酶报告基因检测等方法系统评价各修饰载体的的粒径、电位、胶体稳定性、细胞摄取、mRNA转染效率及细胞毒性。选用50只6~8周龄雌性BALB/c小鼠(体质量约20 g),经鼻内滴注染料标记或负载Fluc-mRNA的制剂,采用小动物活体成像系统观察制剂在其体内分布与肺部转染情况,并于给药24 h后取主要器官进行组织病理学和血清生化分析。**结果** 成功构建了系列阳离子修饰mExos。经筛选,壳聚糖修饰的mExos(Chitosan-modified milk exosomes, CS-mExos)在保持合适粒径和良好稳定性(48 h内PDI无显著变化)的前提下,其表面电位发生了反转。体外实验显示,CS-mExos在16HBE和A549细胞中的摄取效率分别较未修饰mExos提高2.56倍(P<0.001)和4.56倍(P<0.001),并显著提升Fluc-mRNA的转染效率达28.9倍(P<0.001)和26.5倍(P<0.001),且无明显细胞毒性(细胞活力>95%)。活体成像表明,CS-mExos经鼻给药后可特异性富集于肺部并长效滞留至少72 h,且介导的Fluc表达在给药后6 h达峰值,强度为mExos组的9.5倍。组织病理学与血清生化分析显示,CS-mExos未引起明显脏器损伤或肝功能、肾功能指标异常。**结论** 通过系统性筛选,确定CS为优化mExos的mRNA递送性能的最佳阳离子修饰材料。基于此构建的CS-mExos载体能高效靶向递送mRNA至呼吸道,显著提升肺部转染效率并具备良好生物安全性。

[**关键词**] 牛奶外泌体;壳聚糖;信使RNA;肺部给药;基因治疗
[**中图法分类号**] R394.6;R914.5;R944.9 [**文献标志码**] A

Optimizing milk-derived exosome carriers through systematic cationic material screening for efficient pulmonary-targeted mRNA delivery

LUO Mingxing[1], LIAO Rui[1], GUAN Shan[1], ZHANG Weijun[1], LUO Ping[1], ZHANG Yi[1], CHENG Ping[1], LI Yang[2], ZOU Quanming[1] [1]Faculty of Pharmacy and Laboratory Medicine; [2]Department of Pharmacy, First Affiliated Hospital, Army Medical University (Third Military Medical University), Chongqing, China

[**Abstract**] **Objective** To construct an engineered milk-derived exosome (mExos) vector for efficient messenger RNA (mRNA) delivery to the respiratory tract by systematically screening cationic modification

[**基金项目**] 国家自然科学基金面上项目(82173764,32370993);重庆市自然科学基金面上项目(CSTB2025NSCQ-GPX0624)
[**通信作者**] 李 飏,E-mail:liyang871419@163.com
邹全明,E-mail:qmzou2007@163.com

2097-0927/Copyright © 2026,陆军军医大学(第三军医大学)。这篇开放获取文章遵循CC BY许可协议(https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/)
引用格式:罗明星,廖睿,关山,等.通过系统性阳离子材料筛选优化牛奶外泌体载体以实现mRNA的高效肺部靶向递送[J].陆军军医大学学报,2026,48(04):407-419. DOI:10.16016/j.2097-0927.202511021.
Citation:LUO M X,LIAO R,GUAN S,*et al*. Optimizing milk-derived exosome carriers through systematic cationic material screening for efficient pulmonary-targeted mRNA delivery[J]. J Army Med Univ,2026,48(04):407-419. DOI:10.16016/j.2097-0927.202511021.

materials. **Methods** mExos were isolated *via* ultracentrifugation, followed by electroporation-mediated loading of firefly luciferase (Fluc) or enhanced green fluorescent protein (EGFP) mRNA. Chitosan (CS), polyethyleneimine (PEI), poly(beta-amino ester) (PBAE), cationic lipid (DOTAP), and protamine were used to modify mRNA-loaded mExos. Dynamic light scattering, nanoparticle tracking analysis, flow cytometry and luciferase reporter assay were employed to evaluate particle size, zeta potential, colloidal stability, cellular uptake, transfection efficiency, and cytotoxicity. Fifty female BALB/c mice (6 to 8 weeks, about 20 g) received intranasal administration of dye-labeled or Fluc-mRNA-loaded formulations. *In vivo* distribution and pulmonary transfection kinetics were monitored by IVIS imaging, while histopathology and serum biochemistry of major organs were analyzed at 24 h post-administration. **Results** Cationic-modified mExos were successfully constructed. CS-modified mExos (CS-mExos) demonstrated surface charge reversal while maintaining optimal size and stability (PDI unchanged within 48 h). *In vitro*, CS-mExos enhanced cellular uptake in 16HBE and A549 cells by 2.56-fold ($P<0.001$) and 4.56-fold ($P<0.001$), respectively, and increased Fluc-mRNA transfection efficiency by 28.9-fold ($P<0.001$) and 26.5-fold ($P<0.001$) versus unmodified mExos, with >95% cell viability. *In vivo* imaging revealed CS-mExos specifically accumulated in the lungs with sustained retention >72 h, mediating 9.5-fold higher peak Fluc-mRNA expression at 6 h post-administration. Histopathology and serum biochemistry confirmed no significant organ damage or abnormal hepatic/renal indices. **Conclusion** Systematic screening identified chitosan as the optimal cationic material for engineering milk exosomes. The developed CS-mExos vector enables efficient targeted mRNA delivery to the respiratory tract with enhanced pulmonary transfection and favorable biosafety.

[**Key words**] milk-derived exosomes; chitosan; messenger RNA; pulmonary administration; genetic therapy

Supported by the General Program of National Natural Science Foundation of China (82173764, 32370993) and the General Program of Natural Science Foundation of Chongqing (CSTB2025NSCQ-GPX0624). Corresponding authors: LI Yang, E-mail: liyang871419@163.com; ZOU Quanming, E-mail: qmzou2007@163.com

体外转录信使RNA(*in vitro* transcribed messenger RNA,IVT-mRNA)疗法是生物医药领域的技术突破,在传染病预防以及肿瘤免疫治疗等方面潜力巨大[1-4]。然而,mRNA分子本身存在固有的不稳定性、免疫原性及难以自主穿透细胞膜的特性,这些特性限制了其临床应用的范围[5-6]。因此,开发安全、高效、具有靶向性的递送系统,已成为突破当前瓶颈、实现IVT-mRNA药物治疗价值的关键。

外泌体作为一种内源性的纳米级囊泡,凭借其低免疫原性、良好的生物相容性及天然的跨细胞膜能力,被视为极具前景的药物递送载体[7-8]。牛奶来源外泌体(milk-derived exosomes, mExos)因其易于规模化获取,可有效解决细胞来源外泌体产量低与成本限制的问题,展现出独特的应用前景[9-10]。然而,天然mExos在用于IVT-mRNA递送时,仍存在摄取效率低下和转染效率不足的缺陷[11]。

对mExos进行表面工程化改造是提升其递送性能的重要策略[12-13]。阳离子材料(如聚合物、脂质和多肽等)基于静电相互作用能有效浓缩核酸,并增强其与细胞膜的相互作用,被广泛用于提升非病毒载体的递送效率[14-15]。目前,已有多种阳离子材料可用于IVT-mRNA递送系统修饰,例如质子海绵效应显著但细胞毒性较高的聚乙烯亚胺(polyethylenimine, PEI),具有生物降解性的聚(β-氨基酯)[poly(β-amino ester),PBAE],易于形成脂质双层结构的阳离子脂质(1, 2-dioleoyl-3-trimethylammonium-propane chloride, DOTAP)以及细胞穿透能力强的鱼精蛋白(protamine sulfate, Protamine)和生物相容性优良的天然多糖壳聚糖(chitosan, CS)[16-20]。尽管这些材料在理论上均具备改善载体性能的潜力,但目前尚缺乏针对它们在修饰外泌体类递送系统方面的比较研究。现有报道多局限于单一材料,而何种材料能够在高效提升mExos递送效能的同时,兼顾良好生物安全性与制剂稳定性,仍是一个尚未系统阐明的关键科学问题[21]。

基于此,本研究通过一项多维度、平行化的筛选策略,旨在鉴定出用于优化牛奶外泌体肺部IVT-mRNA递送性能的最佳阳离子材料,为开发基于mExos的高效、安全IVT-mRNA递送平台奠定坚实的工程化基础,并为其在肺部基因治疗中的应用提供理论依据与实践探索。

1 材料与方法

1.1 实验动物

选取50只体质量约20 g的6~8周龄SPF级雌性

BALB/c小鼠(购自北京维通利华公司)为实验动物,饲养于陆军军医大学国家免疫生物制品工程技术研究中心SPF级动物房,饲养环境条件为:温度20~25 ℃,相对湿度40%~70%,12 h/12 h明暗循环,自由获取标准饲料和灭菌饮用水。本研究涉及的所有动物实验方案得到陆军军医大学伦理委员会的批准(AMUWEC20210929)。实验过程中,为减少动物疼痛与痛苦,所有操作(包括经鼻给药、麻醉)在熟练操作下快速完成。本研究未发生预期外严重不良事件。

1.2 材料与试剂

16HBE、A549、Raw264.7细胞株为本课题组自备。编码萤火虫荧光素酶(firefly luciferase, Fluc)和增强型绿色荧光蛋白(enhanced green fluorescent protein, EGFP)的质粒由中国金斯瑞公司合成;RPMI 1640、DMEM、opti-MEM培养基、胎牛血清、Pen-Strep双抗、0.25 %胰酶、(1×)PBS、无核酶水购自美国赛默飞公司;氯化钠、蛋白胨、酵母粉、CS、PEI、Protamine购自中国阿拉丁公司;PBAE购自中国瑞禧生物公司;DOTAP购自中国中生华美科学器材有限公司;BCA蛋白浓度测定试剂盒、萤火虫荧光素酶报告基因检测试剂盒购自中国碧云天公司;T7高产量RNA转录试剂盒、Cap1加帽试剂盒购自中国维百奥生物科技有限公司;D-萤光素钾盐购自中国百灵威公司;Gel Extraction试剂盒购自中国永津生物公司;CCK-8试剂购自中国默克公司;其他所有溶剂和试剂均购自中国阿拉丁公司,且为分析级或高效液相色谱(high performance liquid chromatography, HPLC)级。

1.3 牛奶外泌体的提取和分离

脱脂牛奶(800 mL)从当地超市购得。将脱脂牛奶与乙酸按100∶1的体积比混合,于室温静置5 min,随后以4 ℃、12 000×*g*离心15 min。取上清液,经0.22 μm滤膜过滤后获得乳清。乳清再以4 ℃、210 000×*g*超速离心70 min,取底部沉淀,即获得牛奶外泌体。将牛奶外泌体沉淀用PBS重悬后,再次以4 ℃、210 000×*g*超速离心70 min。用PBS洗涤后,沉淀重悬于PBS中,以4 ℃、10 000×*g*离心10 min,去除残留沉淀。总蛋白浓度采用BCA试剂盒测定。牛奶外泌体(浓度<3 mg/mL)随后于-80 ℃保存直至使用。

为量化所提取的外泌体,对mExos的样本进行了蛋白浓度检测。将外泌体沉淀用预冷的RIPA裂解液混匀。接着准备与样品基质完全相同的稀释液(如含1%SDS的PBS),用于配制牛血清白蛋白(bovine serum albumin, BSA)标准品梯度浓度,范围为0~1 500 μg/mL,然后试剂A与试剂B按50∶1的体积比配制BCA工作液。在96孔板中,分别加入25 μL各浓度标准品及待测样品(2个复孔),每孔加入200 μL BCA工作液,轻振混匀后置于37 ℃避光孵育30 min。孵育完成后冷却至室温,立即使用酶标仪在562 nm波长下读取各孔吸光度[*OD*(562)]值。以标准品浓度(μg/mL)为横坐标、平均*OD*(562)值为纵坐标绘制标准曲线,并获得线性回归方程。

1.4 阳离子修饰外泌体的构建及表征

1.4.1 制备阳离子材料修饰的mExos 通过电穿孔将IVT-mRNA加载到mExos中,制备出负载mRNA的mExos。取2×10^9个mExos颗粒(蛋白质含量约为5 μg),以颗粒与缓冲液体积比为1∶9溶解于Gene Pulser电穿孔缓冲液中,随后加入10 mg IVT-mRNA。混合物转移至电穿孔比色杯中,并在冰上预冷。将比色杯插入Gene Pulser Xcell™ Total System中,在以下条件下进行电穿孔:脉冲类型为方波;电压200 V;脉冲长度10 ms;脉冲次数5次;脉冲间隔1 s。最后,使用Ultra-15离心超滤装置(截留分子量100 kDa)进行超滤,将电穿孔缓冲液和浓缩外泌体调整至目标体积,即可获得包载IVT-mRNA的mExos。

对于负载IVT-mRNA的mExos,将其与不同阳离子材料——CS、Protamine、PBAE、PEI以及DOTAP按特定比例孵育,在37 ℃下振荡30~60 min,随后,将混合物以100 000×*g*离心70 min,弃去上清液,保留沉淀,从而获得经不同阳离子材料修饰的外泌体。

1.4.2 载体粒径、多分散指数(polydispersity index, PDI)、Zeta电位及形态的评估 采用动态光散射(dynamic light scattering, DLS)和纳米颗粒追踪分析(nanoparticle tracking analysis, NTA)对mExos及修饰后外泌体的粒径、Zeta电位和粒子浓度进行了评估。通过透射电子显微镜(transmission electron microscope, TEM)观察mExos及修饰后外泌体的形态学特征,观察前将样品用2%磷钨酸负染1 min。

1.4.3 琼脂糖凝胶电泳 采用琼脂糖凝胶电泳对mExos封装Fluc-mRNA的情况进行表征。分别制备以下样品:空白mExos、纯化的Fluc-mRNA、装载后未裂解的mExos样品,以及经1%Triton X-100裂解释放内容的mExos样品。所有样品与上样缓冲液混合后,在1%琼脂糖凝胶(含核酸染料)中进行电泳。电泳在(1×)TAE缓冲液、120 V恒压下进行约20 min。电泳结束后,使用紫外凝胶成像系统观察并采集条带图像。

1.4.4 稳定性考察 为评估阳离子修饰的mExos的胶体稳定性,将样品置于4 ℃ PBS中保存。采用

DLS技术,在保存后的0、4、8、12、16、20、24、36及48 h时间点,分别测定其水合粒径分布与多分散指数。通过对比各时间点数据,分析样品在储存期间粒径与均一性的变化情况。

1.5 mRNA/CS-mExos体外递送能力的评估

1.5.1 CS-mExos在不同细胞中的摄取能力 将16HBE细胞(2×10^5/孔)、A549细胞(2×10^5/孔)、Raw264.7细胞(1×10^5/孔)接种于24孔板中,培养过夜。当细胞融合度达到约70%时,每孔加入DiD标记的阳离子修饰的mExos(DiD与mExos按体积比1∶100孵育标记)。孵育4 h后,用胰酶(不含EDTA)消化,并轻轻吹打使贴壁细胞脱落。随后,以800 r/min离心5 min收集细胞,并重悬于PBS中计数。使用流式细胞仪进行检测并分析阳性细胞的比例。

1.5.2 mRNA/CS-mExos对不同细胞的转染效率 将16HBE、A549、RAW264.7细胞复苏,于37 ℃、5%CO_2的培养箱中常规培养,待融合率60%~80%时,进行消化和计数,调整细胞数量至2×10^4个/孔铺于96孔板中。将PBS缓冲液、400 ng裸Fluc-mRNA以及各含400 ng Fluc-mRNA的mExos、CS-mExos、Lipofectamine® 2000制剂分别与100 μL opti-MEM混合后加入各孔中。于培养箱中培养4 h,更换opti-MEM为含双抗和FBS的RPMI 1640培养基,继续培养24 h。使用Fluc报告基因检测试剂盒检测每孔化学发光信号相对强度。

1.5.3 细胞毒性实验 细胞活力通过CCK-8法进行检测。将16HBE细胞(3×10^4/孔)、Raw264.7细胞(3×10^4/孔)和A549细胞(2×10^4/孔)接种于96孔板中,培养24 h。随后,用含400 ng IVT-mRNA/孔的mExos/CS-mExos处理细胞,并在无血清opti-MEM培养基中于37 ℃孵育6 h。处理后,更换为新鲜完全培养基,继续孵育24 h。为进行CCK-8分析,每孔加入10 μL CCK-8试剂,在37 ℃下孵育2 h。使用Varioskan™ LUX微板读数仪在450 nm波长处测定吸光度[$OD(450)$]值。未处理细胞作为100%活力对照,仅含培养基的空白孔用于背景校正。

1.5.4 荧光检测评估制剂的转染效率 为评估制剂介导的EGFP-mRNA在16HBE细胞中的表达效率,通过荧光显微镜观察并分析EGFP阳性细胞的荧光强度。将400 ng裸EGFP mRNA(编码增强型绿色荧光蛋白的IVT-mRNA)和各含400 ng EGFP mRNA的制剂,按"1.5.2"中步骤转染16HBE细胞。完成后加入PBS润洗并弃去孔内液体,并使用倒置荧光显微镜观察。

1.6 体内递送与安全性评价

1.6.1 体内分布与mRNA递送效率 使用荧光染料1,1-二十八烷基-3,3,3,3-四甲基吲哚三羰花青碘化物(1,1′-dioctadecyl-3,3,3′,3′-tetramethylindotricarbocyanine perchlorate,DiR)标记CS-mExos(染料浓度为0.05 mmol/L)。在37 ℃下孵育2 h后,使用Ultra-15离心超滤装置(截留分子量100 kDa),于4 ℃、10 000×g离心15 min,去除未结合的游离染料。随后,所得DiR标记的CS-mExos/mExos以每只小鼠2×10^9个颗粒的剂量经鼻内滴注途径给药至肺部。采用IVIS Spectrum成像系统观察荧光信号。为进行离体可视化,在任意时间点取主要器官,测定DiR荧光信号。活体生物发光与活体生物分布实验中,BALB/c小鼠经鼻内滴注途径给予含5 μg Fluc-mRNA的CS-mExos制剂,用于生物发光追踪。给药6 h后,腹腔注射D-荧光素(150 mg/kg)。采用IVIS Lumina Ⅲ系统进行全身生物发光成像(曝光时间60~120 s,视野15~25 cm),随后采集小鼠主要器官(肺、心、肠、肝、脾、肾)。取出的器官未经灌注即进行荧光成像(激发波长640 nm,发射波长680 nm),生物发光信号通过Living Image 4.5软件定量分析,荧光强度则以组织质量为基准进行归一化处理。

1.6.2 体内安全性检测 在给予CS-mExos/mExos(剂量:5 μg mRNA/只)后24 h,取出主要器官(肺、心、肠、肝、脾、肾),用4%多聚甲醛固定,经石蜡包埋处理。制备5 μm厚的组织切片,进行苏木精-伊红(hematoxylin and eosin staining, HE)染色,随后使用尼康Eclipse Ci-L显微镜观察,以分析病理变化。为评估CS-mExos/mExos的安全性,将制剂(50 μL/只)通过呼吸道给药方式给予BALB/c小鼠。给药后24 h,经眼眶后静脉采血获取全血,在室温下以3 000×g离心5 min,以分离血清。所得血清样本提交至Servicebio(中国武汉)进行综合生化分析。生化指标包括肝功能标志物[丙氨酸氨基转移酶(alanine aminotransferase, ALT)和天门冬氨酸氨基转移酶(aspartate aminotransferase, AST)],肾功能标志物[尿素氮(urea nitrogen, Urea)和乳酸脱氢酶(lactate dehydrogenase, LDH)]。所有检测按照标准临床化学规程,使用自动生化分析仪进行测定。

1.7 统计学分析

连续变量以$\bar{x}\pm s$表示,百分比或比例数据(如流式细胞术检测的阳性细胞百分比)以原始值或适当转换后纳入分析。采用GraphPad Prism 8.0软件进行统计分析。若数据符合正态分布且方差齐性,采用单因素方差分析(One-way ANOVA),随后进行Tukey多重比较检验;若不符合参数检验条件,则采用Kruskal-Wallis非参数检验,以Dunn's多重比较检验。$P<0.05$表示差异具有统计学意义。

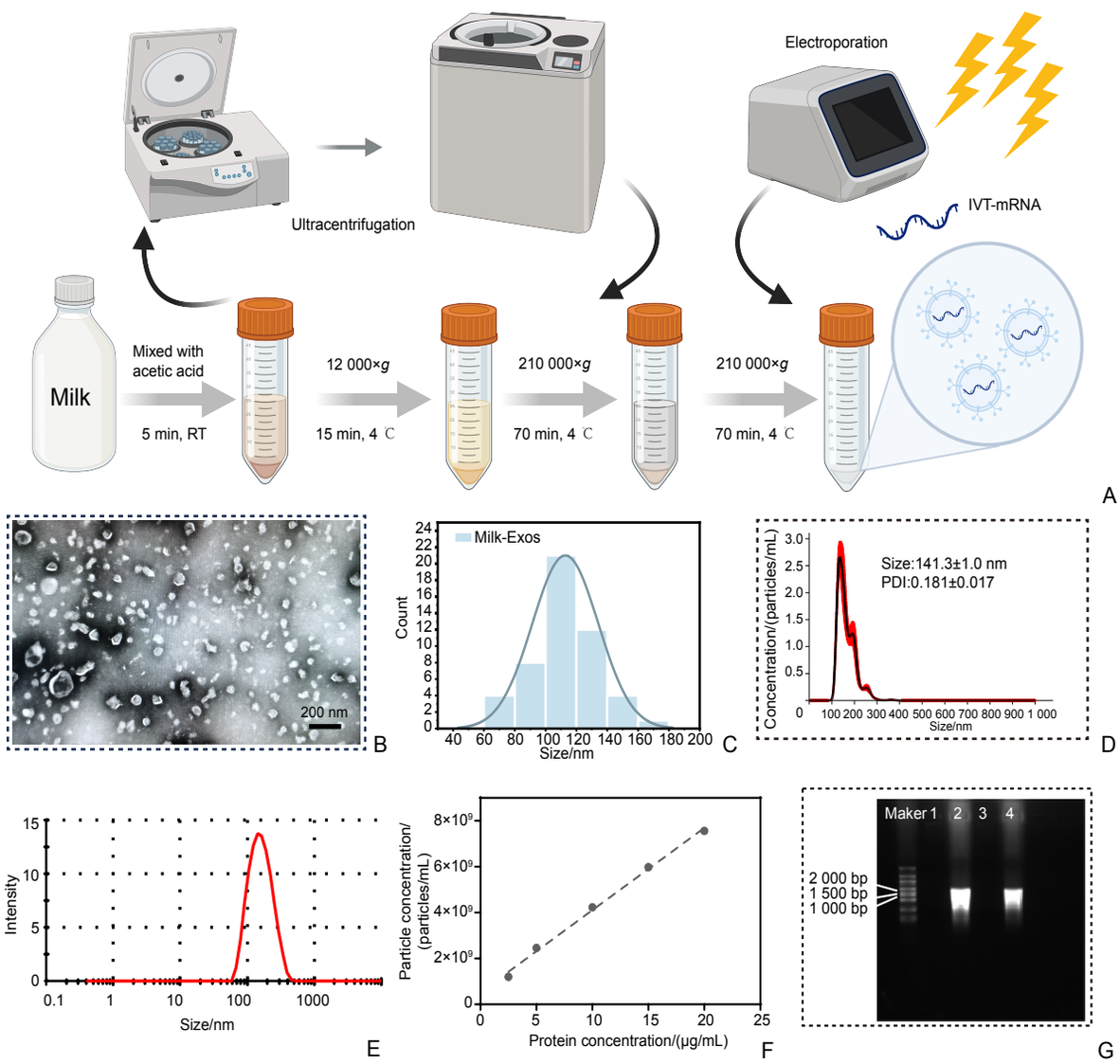
2　结果

2.1　mExos的提取和表征

通过优化的超速离心法并结合1%冰乙酸预处理去除酪蛋白,成功分离出mExos(图1A)。TEM观察显示,这些外泌体具有典型的杯状形态,直径为80~100 nm(图1B、C)。DLS测得mExos的水合粒子大小为(141.3±1.0)nm(图1D、E)。相对较低的PDI(0.181±0.017)和相对较高的产量[$(5.16\times10^{11}\pm7.98\times10^{9})$个/mL]表明mExos成功分离(图1F)。IVT-mRNA可通过电穿孔成功加载到mExos系统。琼脂糖凝胶电泳证实了IVT-mRNA的完全保护:在负载的外泌体中未观察到游离RNA条带(第3泳道),而Triton X-100处理后释放出完整的IVT-mRNA且无降解(第4泳道与对照第2泳道相比),见图1G。

2.2　阳离子材料修饰外泌体的构建

本研究通过DLS与TEM等方法,系统评估了5种阳离子材料(CS、PEI、PBAE、DOTAP、Protamine)在不同修饰比例下对mExos粒径、PDI及Zeta电位的影响。热图分析显示,随着修饰比例增加,各组粒径与Zeta电



A: Extraction and isolation processes of mExos and the loading of IVT-mRNA; B: TEM images of mExos; C: Histogram of particle size distribution measured using Image J; D and E: Results of nanoparticle tracking analysis of mExos, as well as particle size and PDI measured by DLS and NTA (n=3, $\bar{x}\pm s$); F: Relationship between protein concentration measured by BCA assay and particle concentration measured by NTA; G: Gel electrophoresis of mRNA. Lane 1: Control (mExos), Lane 2: naked Fluc-mRNA, Lane 3: Fluc-mRNA encapsulated in mExos, Lane 4: Fluc-mRNA encapsulated in mExos with Triton X-100 treatment

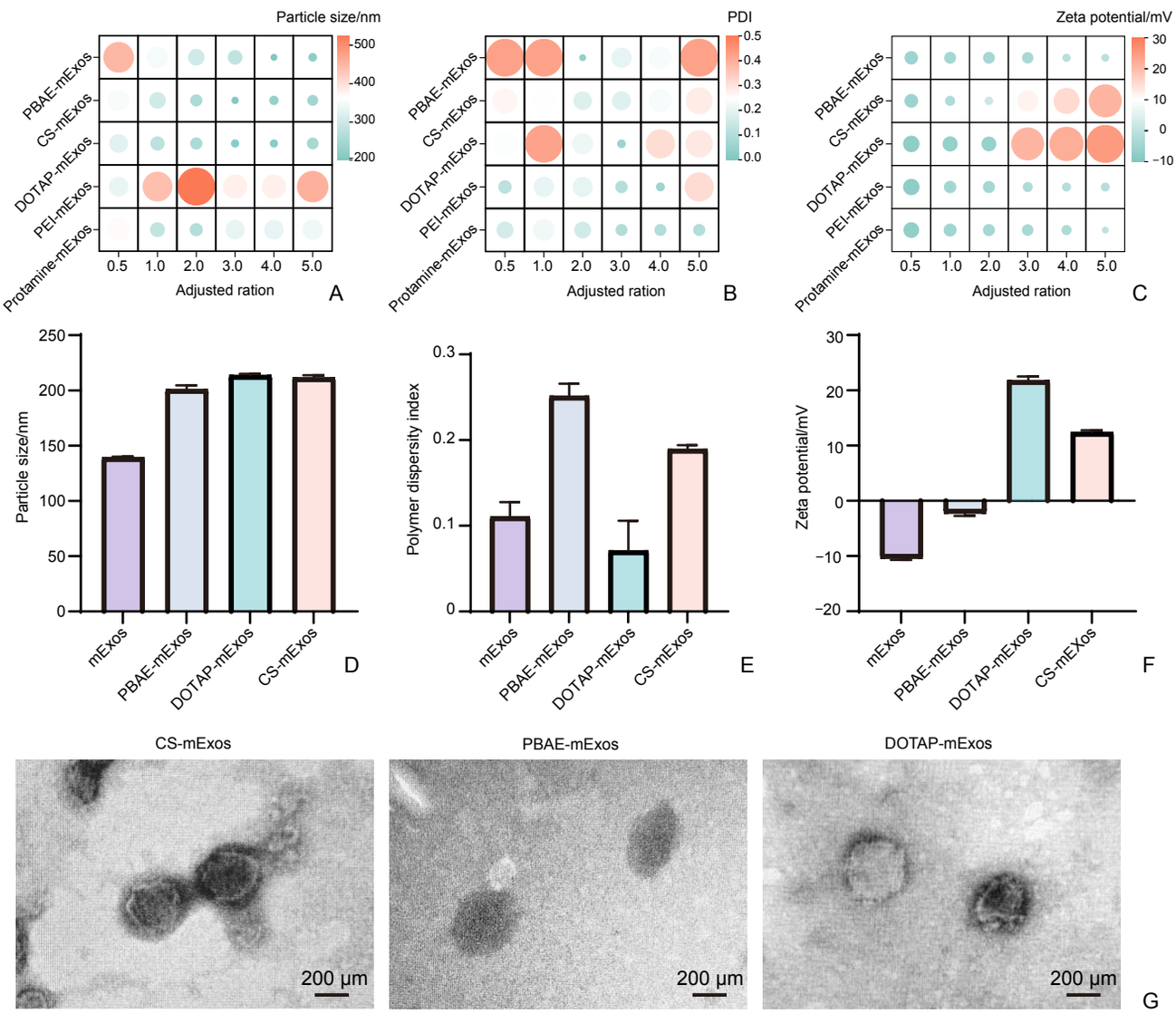
图1　牛奶外泌体的提取及表征

Figure 1　Extraction and characterization of mExos

位均呈现不同程度上的变化(图2A~C)。在优化比例下,CS-mExos、PBAE-mExos和DOTAP-mExos的粒径分别为(207.2±3.2)nm、(201.9±5.1) nm和(216.4±6.8) nm,Zeta电位分别转变为(+11.8±1.2)mV、(−1.31±1.1) mV和(+22.1±1.8) mV(图2D~F)。而PEI-mExos和Protamine-mExos的粒径>250 nm且PDI>0.3,故予以排除。基于粒径与PDI的初步筛选结果,本研究选择了最佳粒径的修饰外泌体,并后续对CS-mExos、PBAE-mExos和DOTAP-mExos进行深入的功能比较。此外,通过TEM对优选比例下修饰的外泌体进行形貌观察,结果显示,CS-mExos等载体仍保持典型的囊泡状结构,表明修饰过程未破坏其基本完整性(图2G)。

2.3 系统性筛选最优阳离子修饰外泌体CS-mExos

为系统评估阳离子修饰mExos(即CS-mExos、PBAE-mExos和DOTAP-mExos)的性能,本研究通过流式细胞术、荧光素酶报告基因检测及稳定性试验进行了多维度筛选,重点关注细胞摄取、IVT-mRNA转染效率及胶体稳定性。流式细胞术结果显示,CS-mExos在16HBE和A549细胞中的摄取效率分别较未修饰mExos提高2.56倍(P<0.001)和4.56倍(P<0.001,图3A、B)。

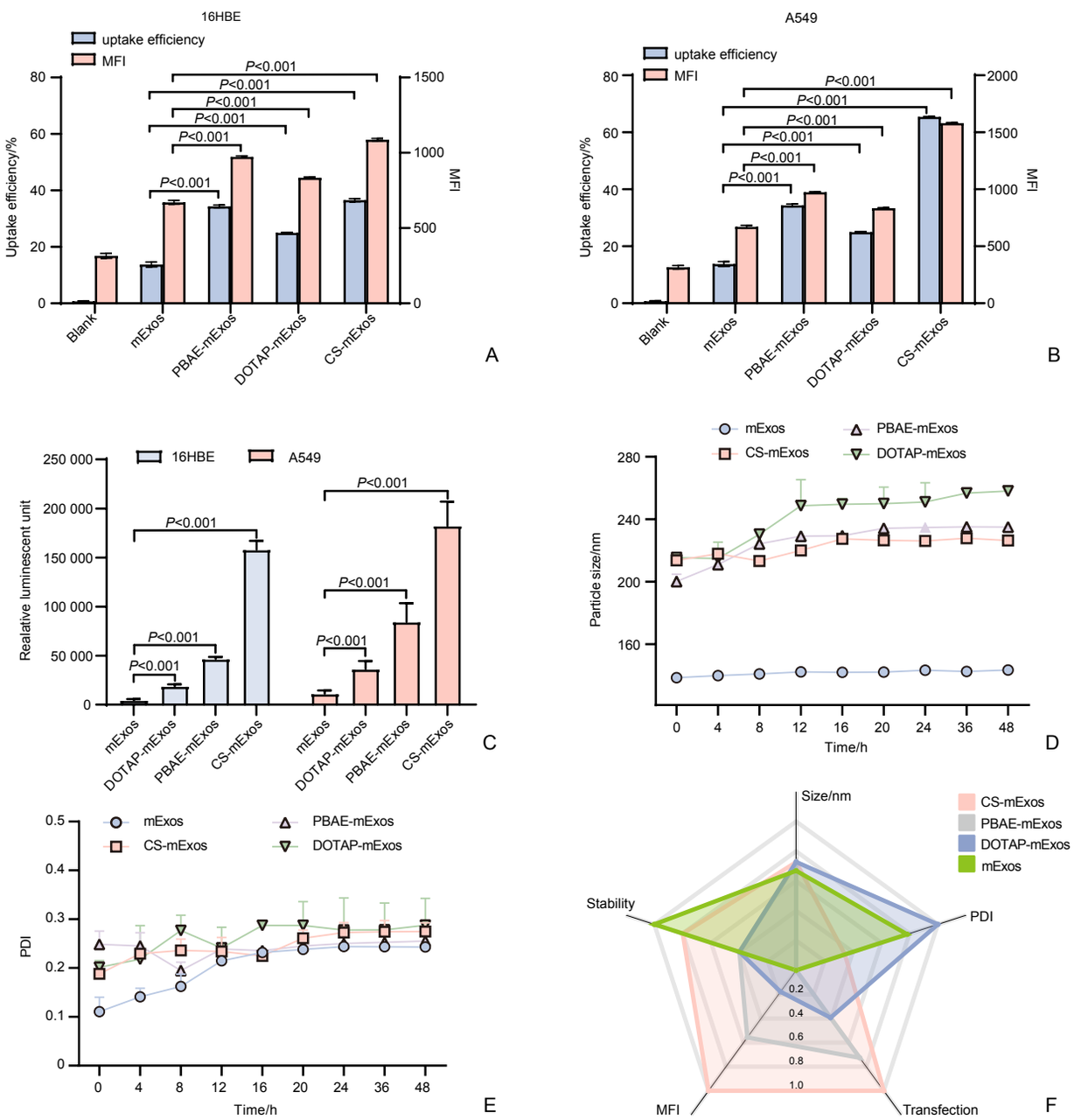


A~C: Heatmap analysis of particle size (A), PDI (B) and zeta potential (C) of mExos modified with cationic materials at varying modification ratios; D~F: Comparison of key physicochemical properties after modification with indicated cationic materials, including particle size (D), PDI (E), and zeta potential (F) (n=3); G: Transmission electron microscopy images of exosomes modified with cationic materials

图2 不同纳米颗粒的构建及表征

Figure 2 Construction and characterization of different nanoparticles

报告基因检测表明,与未修饰mExos相比,CS-mExos介导的Fluc-mRNA在16HBE和A549细胞中的表达量分别提升28.9倍(P<0.001)与26.5倍(P<0.001,图3C)。稳定性试验显示,CS-mExos在4 ℃的PBS中保存48 h,其粒径与PDI均无显著变化(图3D、E)。最佳制剂的选择基于对5个关键性能参数(粒径、PDI、摄取率、转染效率及稳定性)的整体评估,而非单一指标。这种综合方法避免了因优化某一性能而牺牲其他性能的潜在弊端。CS-mExos在这些指标间达到了最大面积,因此CS-mExos被确定为最优制剂用于后续研究(图3F)。



A and B: The intracellular uptake of DiD-labeled mExos or mExos modified with various cationic materials was detected by flow cytometry in 16HBE cells and A549 cells; C: Bioluminescence intensity reflecting Fluc-mRNA transfection efficiency mediated by mExos/cationic materials in 16HBE and A549 cells; D and E: Stability evaluation of mExos or various cationic materials modified mExos in PBS; F: Comparative assessment of mExos and cationic modification strategies across 5 performance dimensions *via* radar chart

图3　最优候选物CS-mExos的筛选结果(n=3)

Figure 3　Screening results of the optimal candidate CS-mExos (n=3)

2.4 CS-mExos的体外mRNA递送能力

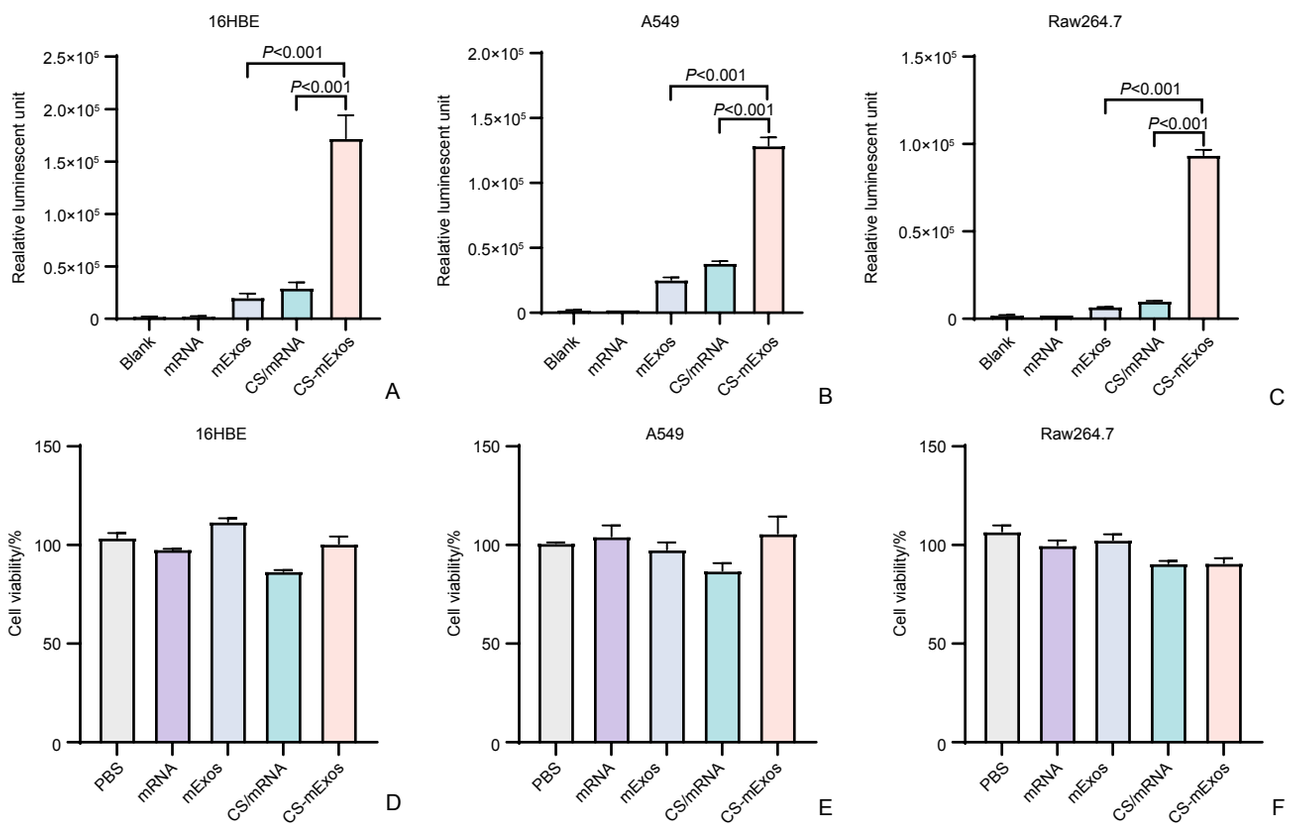
采用荧光素酶报告基因、CCK-8及荧光检测等方法,进一步验证了CS-mExos在不同细胞系中的递送效率、安全性及蛋白表达能力。在16HBE、A549及Raw264.7细胞中,CS-mExos介导的Fluc表达强度均显著高于未修饰mExos及单纯CS/mRNA复合物(P均<0.001,图4A~C)。CS-mExos的转染效率显著高于相同原料制备的单纯CS/mRNA复合物,这一对比直接证实了其卓越性能并非源于游离的CS/mRNA复合物,而是依赖于CS与mExos整合后形成的工程化载体本身。CCK-8实验表明,CS-mExos处理组细胞活力均高于95%,与对照组无明显差异(图4D~F)。此外,装载EGFP-mRNA的CS-mExos在16HBE细胞中显示出强烈的绿色荧光信号,而mExos组信号微弱(图4G)。综上表明,CS-mExos能高效、安全地将mRNA递送至多种呼吸道相关细胞并介导高水平蛋白表达,其性能优于单纯材料复合物及未修饰外泌体。

2.5 CS-mExos的体内分布及mRNA递送能力

利用小动物活体成像系统,经鼻给药后动态监测了DiR标记的载体分布及Fluc-mRNA在肺部的表达。体内分布显示,CS-mExos在给药后12 h于肺部富集显著高于mExos组,并可滞留至少72 h(图5A、D)。离体器官成像证实,荧光信号主要集中于肺部,其他脏器未见明显蓄积(图5B、E)。Fluc报告基因表达动力学表明,CS-mExos组在给药后6 h肺部生物发光信号达峰值,强度为mExos组的9.5倍,且表达可持续至72 h(图5C、F)。表明CS-mExos经鼻腔给药后可高效靶向并滞留于肺部,并能介导mRNA在肺组织中持续、高水平的蛋白表达。

2.6 载体的体内安全性评价

通过组织病理学染色与血清生化分析,系统性评估了CS-mExos的体内生物安全性。HE染色结果显

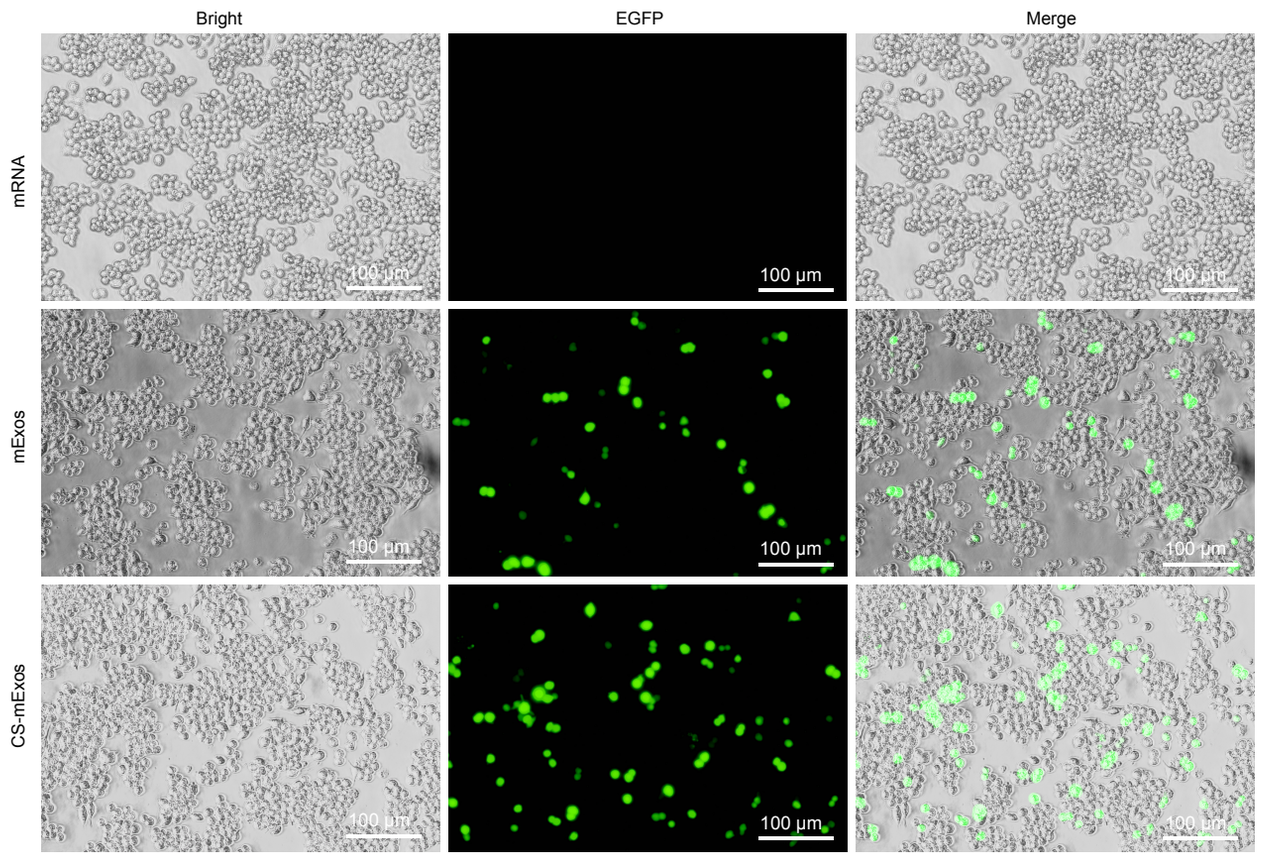


A~C: Comparison of Fluc-mRNA transfection efficiency mediated by mExos, CS/mRNA, and CS-mExos in various cell lines (16HBE, A549, Raw264.7); D~E: Comparison of cell viability by CCK-8 assay after treatment with CS-mExos, CS/mRNA, mExos or naked mRNA (control) across 16HBE, A549, and Raw264.7 cell lines

图4 制剂的细胞摄取、蛋白表达与细胞毒性

Figure 4 Cell uptake, protein expression, and cytotoxicity of the preparation

图4G续下页



G: Comparison of eGFP-mRNA delivery by mExos versus CS-mExos in 16HBE cells, visualized by fluorescence microscopy at 6 h post-transfection

续图4 制剂的细胞摄取、蛋白表达与细胞毒性

Figure 4(continued) Cell uptake, protein expression and cytotoxicity of the preparation

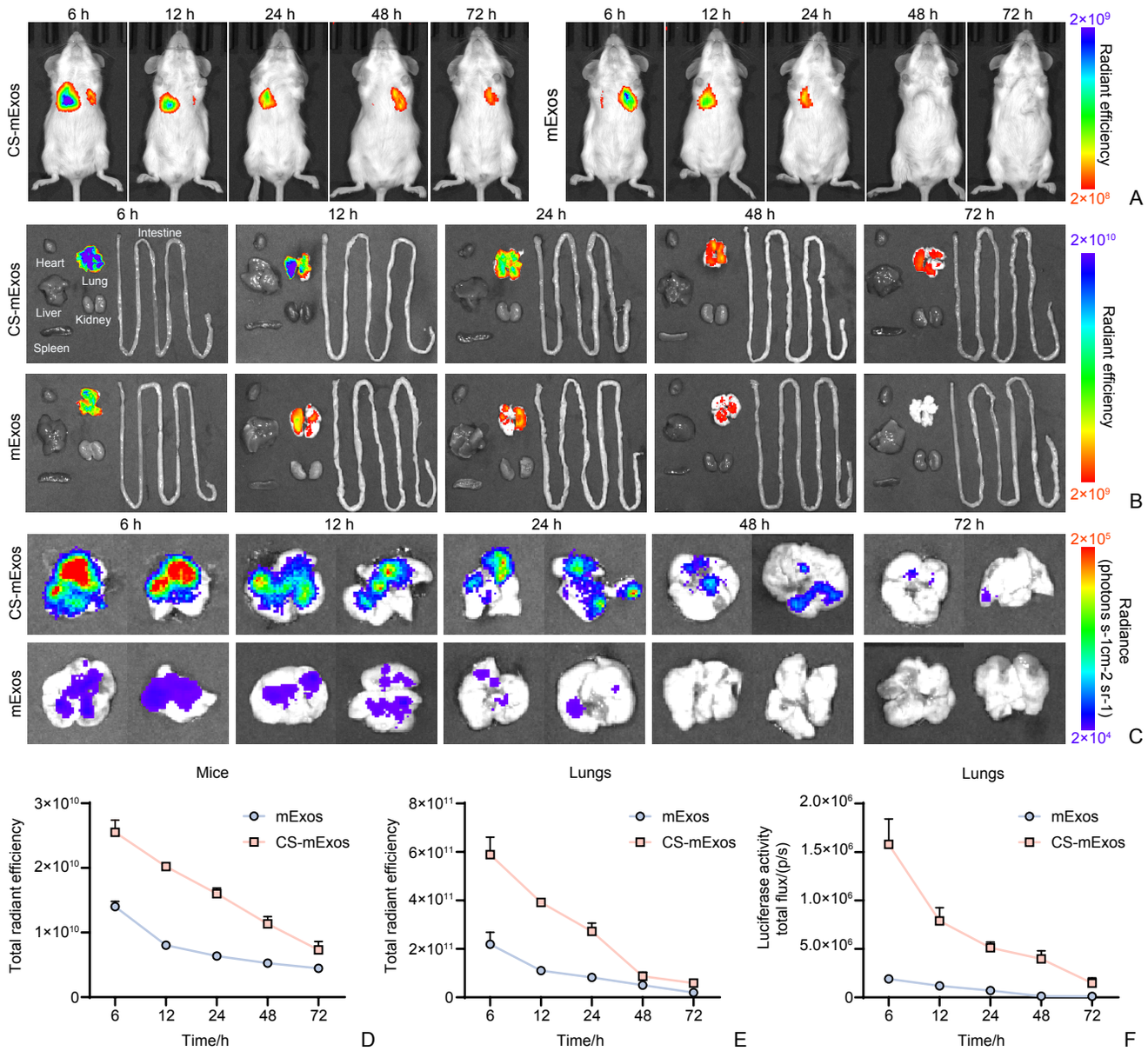
示,经CS-mExos处理24 h后的小鼠心、肝、脾、肺、肾等重要脏器组织结构完整,未见坏死、充血、出血或炎性浸润等病理改变(图6A)。血清生化分析表明,CS-mExos组小鼠的肝功能指标(ALT、AST)、LDH及肾功能指标(Urea)均处于正常范围,与PBS及mExos对照组无明显差异(图6B~E)。表明单次呼吸道给予CS-mExos未引起明显全身毒性及主要脏器损伤,表明该递送系统具有良好的体内生物安全性。

3 讨论

mRNA疗法的临床转化亟须安全、高效的递送系统。外泌体作为内源性纳米囊泡,凭借其低免疫原性与良好生物相容性,被视为极具潜力的递送载体。其中,mExos因其来源广泛、易于规模化生产而受到关注。然而,天然mExos的核酸递送效率有限,需通过工程化修饰来提升其性能[22-23]。与已有递送系统相比,阳离子材料直接修饰法操作简便、条件温和,适于多材料平行筛选[24-26]。本研究系统比较了5种阳离子材料对mExos的修饰效果。结果表明,CS在提升递送效率、维持载体稳定性和保障生物安全性方面展现出最佳综合性能,成功构建了肺部靶向mRNA递送平台CS-mExos。

3.1 阳离子材料系统性筛选与CS的优选

尽管多种阳离子材料已被广泛用于增强核酸递送,但其在修饰天然外泌体时的综合性能缺乏系统的平行比较。本研究通过涵盖理化性质、细胞功能与制剂稳定性的多参数评价体系进行筛选,发现不同材料的修饰效果存在显著差异。其中,CS-mExos在维持适宜纳米粒径与良好胶体稳定性的同时,将其表面电位由负值反转为+11.8 mV。这一适中的正电荷密度有效增强了载体与带负电的细胞膜及mRNA的静电相互作用,从而在16HBE和A549细胞中分别将细胞摄取效率提高了2.56倍和4.56倍,并将mRNA转染效率提升了28.9倍和26.5倍,且未引起明显细胞毒性。



A: Biodistribution of DiR-labeled CS-mExos and mExos in BALB/c mice after respiratory administration; B: Organ imaging at selected time points post-administration of DiR-labeled CS-mExos and mExos; C: Expression kinetics of Fluc-mRNA in mouse lungs mediated by intranasally administered CS-mExos or mExos over time; D: Quantitative analysis of fluorescence signal intensity in mice over time; E: Quantification of fluorescence signal in mouse lung tissues at indicated time points; F: Luciferase signal intensity in mouse lungs after intranasal delivery of CS-mExos and mExos

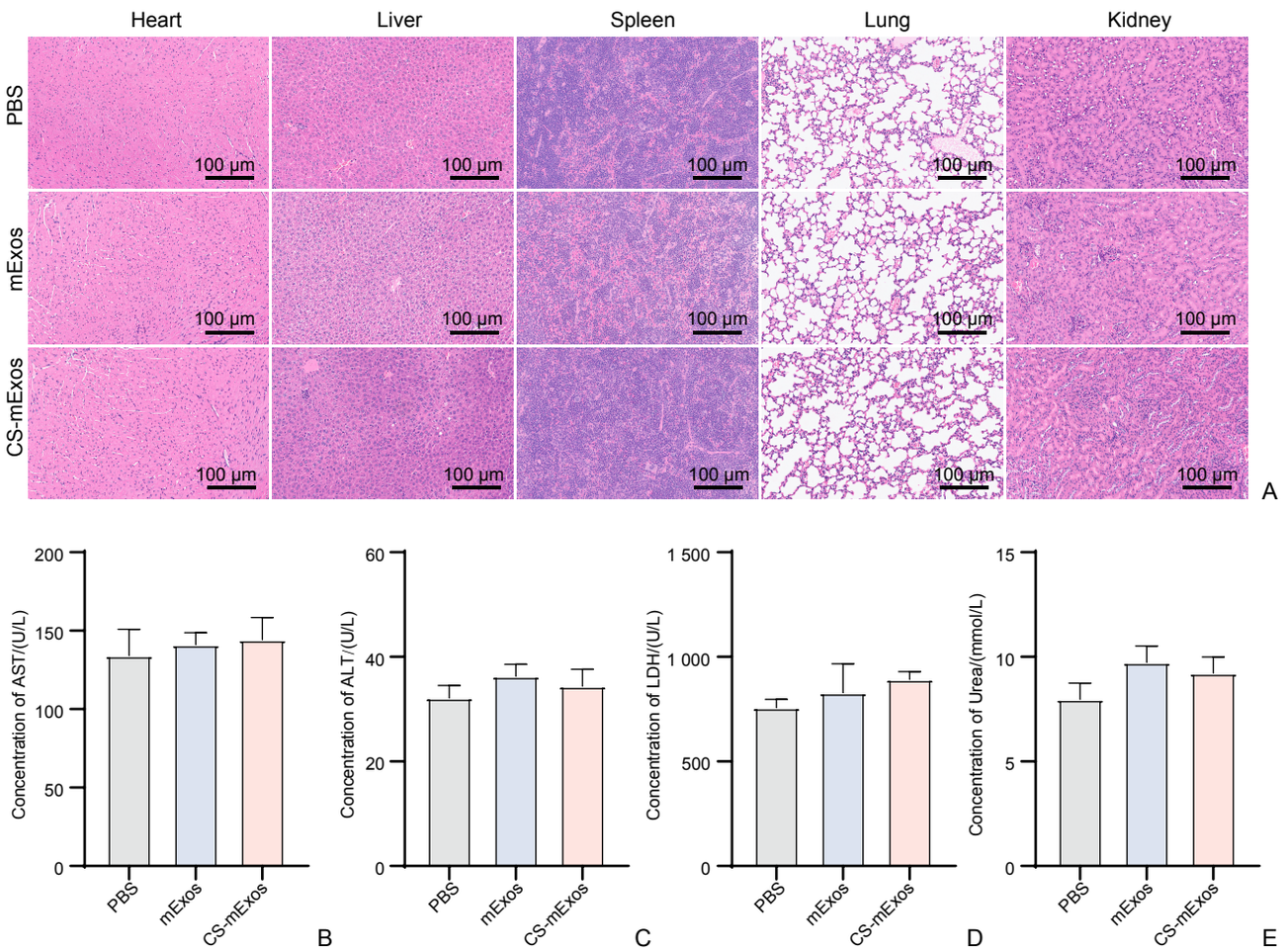
图5 CS-mExos在体内的分布及递送能力(n=3)

Figure 5 Distribution of CS-mExos *in vivo* and their delivery capacity(n=3)

这种改善可能归因于壳聚糖的电荷特性、生物相容性及其结构灵活性的综合作用[27-28]。相比之下,PEI修饰虽能提升转染效率,但其伴随的显著细胞毒性及对载体粒径和均一性的负面影响限制了其应用[29]。综合来看,CS以其适中的正电荷密度、良好的生物可降解性与生物相容性,在效率、稳定性和安全性之间取得了最佳平衡[30-31],因此被确立为优化mExos递送性能的首选材料。

3.2 CS-mExos具有较高的递送效能与生物安全性

为明确CS-mExos的高性能源于其工程化载体本身而非游离组分,本研究设置了严格对照。体外实验证实,纯化后CS-mExos的转染效率显著高于由相同投



A: Histopathological examination of heart, liver, spleen, lung, and kidney tissues at 24 h post-intranasal administration of PBS, mExos, or CS-mExos; B~E: Comparative analysis of blood biochemical parameters in mice following intranasal administration of PBS, mExos or CS-mExos

图6 CS-mExos的体内安全性评价（n=3）

Figure 6 *In vivo* safety evaluation of CS-mExos（n=3）

料量CS与mRNA直接混合制备的简单复合物,表明其性能提升依赖于CS与mExos整合后形成的新型功能载体。其协同增效机制可能在于:mExos的天然脂质双层为mRNA提供了物理保护并赋予其低免疫原性;同时,CS的引入通过电荷介导的内吞促进作用,协同增强了胞内递送与蛋白表达效率。动物实验进一步验证了该载体的体内优势:经鼻腔给药后,CS-mExos表现出显著的肺部靶向富集与长效滞留能力(>72 h),其介导的肺部报告基因表达峰值强度较未修饰mExos提升9.5倍。系统的体内安全性评估显示,CS-mExos未引起主要脏器病理损伤或血清生化指标异常,证实了其良好的生物相容性。

综上所述,本研究通过系统性筛选,确立了CS为优化mExos递送性能的最佳阳离子材料。所构建的CS-mExos平台融合了天然外泌体的生物相容性与合成材料的转染增强能力,在动物水平实现了高效、安全的肺部靶向mRNA递送。相较于制备复杂的杂交体系或依赖基因操作的靶向修饰策略,CS直接修饰法更简便、易于标准化,为开发基于外泌体的基因治疗递送系统提供了新方案。未来工作可进一步探索CS-mExos递送治疗性mRNA的疾病模型疗效,并推进其规模化生产工艺研究。

利益冲突 本文所有作者声明不存在利益冲突

参考文献:

[1] POLACK F P, THOMAS S J, KITCHIN N, *et al*. Safety and efficacy of the BNT162b2 mRNA covid-19 vaccine[J]. N Engl J Med, 2020, 383(27): NEJMoa2034577. DOI:

10.1056/NEJMoa2034577.

[2] BADEN L R, EL SAHLY H M, ESSINK B, *et al*. Efficacy and safety of the mRNA-1273 SARS-CoV-2 vaccine[J]. N Engl J Med, 2021, 384(5): NEJMoa2035389. DOI: 10.1056/NEJMoa2035389.

[3] MIAO L, ZHANG Y, HUANG L. mRNA vaccine for cancer immunotherapy[J]. Mol Cancer, 2021, 20(1): 41. DOI: 10.1186/s12943-021-01335-5.

[4] YE Z F, HARMON J, NI W, *et al*. The mRNA vaccine revolution: COVID-19 has launched the future of vaccinology[J]. ACS Nano, 2023, 17(16): 15231-15253. DOI: 10.1021/acsnano.2c12584.

[5] WENG Y H, LI C H, YANG T R, *et al*. The challenge and prospect of mRNA therapeutics landscape[J]. Biotechnol Adv, 2020, 40: 107534. DOI: 10.1016/j.biotechadv.2020.107534.

[6] VERBEKE R, HOGAN M J, LORÉ K, *et al*. Innate immune mechanisms of mRNA vaccines[J]. Immunity, 2022, 55(11): 1993-2005. DOI: 10.1016/j.immuni.2022.10.014.

[7] SHARMA V, DAS MUKHOPADHYAY C. Exosome as drug delivery system: Current advancements[J]. Extracell Vesicle, 2024, 3: 100032. DOI: 10.1016/j.vesic.2023.100032.

[8] KALLURI R, LEBLEU V S. The biology, function, and biomedical applications of exosomes[J]. Science, 2020, 367(6478): eaau6977. DOI: 10.1126/science.aau6977.

[9] ADRIANO B, COTTO N M, CHAUHAN N, *et al*. Milk exosomes: Nature's abundant nanoplatform for theranostic applications[J]. Bioact Mater, 2021, 6(8): 2479-2490. DOI: 10.1016/j.bioactmat.2021.01.009.

[10] LI S Y, TANG Y, DOU Y S. The potential of milk-derived exosomes for drug delivery[J]. Curr Drug Deliv, 2021, 18(6): 688-699. DOI: 10.2174/1567201817666200817112503.

[11] BONSERGENT E, GRISARD E, BUCHRIESER J, *et al*. Quantitative characterization of extracellular vesicle uptake and content delivery within mammalian cells[J]. Nat Commun, 2021, 12(1): 1864. DOI: 10.1038/s41467-021-22126-y.

[12] SALUNKHE S, DHEERAJ, BASAK M, *et al*. Surface functionalization of exosomes for target-specific delivery and *in vivo* imaging & tracking: Strategies and significance[J]. J Control Release, 2020, 326: 599-614. DOI: 10.1016/j.jconrel.2020.07.042.

[13] RICHARDSON J J, EJIMA H. Surface engineering of extracellular vesicles through chemical and biological strategies[J]. Chem Mater, 2019, 31(7): 2191-2201. DOI: 10.1021/acs.chemmater.9b00050.

[14] HOSSEINI-KHARAT M, BREMMELL K E, GRUBOR-BAUK B, *et al*. Enhancing non-viral DNA delivery systems: Recent advances in improving efficiency and target specificity[J]. J Control Release, 2025, 378: 170-194. DOI: 10.1016/j.jconrel.2024.12.002.

[15] ZHANG M Z, CHEN X X, LI C, *et al*. Charge-reversal nanocarriers: an emerging paradigm for smart cancer nanomedicine[J]. J Control Release, 2020, 319: 46-62. DOI: 10.1016/j.jconrel.2019.12.024.

[16] CASPER J, SCHENK S H, PARHIZKAR E, *et al*. Polyethylenimine (PEI) in gene therapy: Current status and clinical applications[J]. J Control Release, 2023, 362: 667-691. DOI: 10.1016/j.jconrel.2023.09.001.

[17] IQBAL S, ZHAO Z X. Poly (β amino esters) copolymers: Novel potential vectors for delivery of genes and related therapeutics[J]. Int J Pharm, 2022, 611: 121289. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2021.121289.

[18] HOU X C, ZAKS T, LANGER R, *et al*. Lipid nanoparticles for mRNA delivery[J]. Nat Rev Mater, 2021, 6(12): 1078-1094. DOI: 10.1038/s41578-021-00358-0.

[19] JARZEBSKA N T, MELLETT M, FREI J, *et al*. Protamine-based strategies for RNA transfection[J]. Pharmaceutics, 2021, 13(6): 877. DOI: 10.3390/pharmaceutics13060877.

[20] SARANYA N, MOORTHI A, SARAVANAN S, *et al*. Chitosan and its derivatives for gene delivery[J]. Int J Biol Macromol, 2011, 48(2): 234-238. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2010.11.013.

[21] PALAKURTHI S S, SHAH B, KAPRE S, *et al*. A comprehensive review of challenges and advances in exosome-based drug delivery systems[J]. Nanoscale Adv, 2024, 6(23): 5803-5826.

[22] GUO Z Y, TANG Y, CHENG Y C. Exosomes as targeted delivery drug system: advances in exosome loading, surface functionalization and potential for clinical application[J]. Curr Drug Deliv, 2024, 21(4): 473-487. DOI: 10.2174/1567201819666220613150814.

[23] TIMOFEEVA A M, PARAMONIK A P, SEDYKH S S, *et al*. Milk exosomes: next-generation agents for delivery of anticancer drugs and therapeutic nucleic acids[J]. Int J Mol Sci, 2023, 24(12): 10194. DOI: 10.3390/ijms241210194.

[24] XIE X X, ZHOU X, CHEN W, *et al*. Hybrid exosome-liposome nanoparticles for dual modulation of neuroinflammation and lipid metabolism in ischemic stroke[J]. ACS Nano, 2025, 19(37): 33567-33586. DOI: 10.1021/acsnano.5c11417.

[25] HU T Q, ZHOU C K, CHEN Y X, *et al*. TLyp-1-modified exosome-mediated delivery of circRAPGEF5 ASO inhibits lung adenocarcinoma metastasis *via* regulating the miR-570-3p/SPP1 axis[J]. Mater Today Bio, 2025, 35: 102416.

DOI:10.1016/j.mtbio.2025.102416.

[26] SHUAI Q, ZHU F T, ZHAO M D, *et al*. mRNA delivery *via* non-viral carriers for biomedical applications [J]. Int J Pharm, 2021, 607: 121020. DOI: 10.1016/j. ijpharm. 2021.121020.

[27] ACHARYA B, BEHERA A, DESHMUKH K, *et al*. Biocompatibility, biodegradability, and toxicity evaluations of chitosan nanoparticles[M]//Fundamentals and biomedical applications of chitosan nanoparticles. Amsterdam: Elsevier, 2025: 139-187. DOI:10.1016/b978-0-443-14088-4.00007-1.

[28] STEFANACHE A, LUNGU I I, ANTON N, *et al*. Chitosan nanoparticle-based drug delivery systems: advances, challenges, and future perspectives[J]. Polymers, 2025, 17(11): 1453. DOI:10.3390/polym17111453.

[29] ISMAIL A, CHOU S F. Polyethylenimine carriers for drug and gene delivery[J]. Polymers, 2025, 17(15): 2150. DOI:10.3390/polym17152150.

[30] PATHAK R, BHATT S, PUNETHA V D, *et al*. Chitosan nanoparticles and based composites as a biocompatible vehicle for drug delivery: a review[J]. Int J Biol Macromol, 2023, 253: 127369. DOI:10.1016/j.ijbiomac.2023.127369.

[31] OBEIDAT W M, LAHLOUH I K. Chitosan nanoparticles: approaches to preparation, key properties, drug delivery systems, and developments in therapeutic efficacy [J]. AAPS PharmSciTech, 2025, 26(5): 108. DOI: 10.1208/s12249-025-03100-z.

(收稿:2025-11-04;修回:2026-01-09)

(编辑 严 涵)