外泌体的生物学性质及应用概述

史玉潇[1,2]，芦晓红[1]，卢望丁[1*]，罗华菲[1*]
（1. 中国医药工业研究总院医药先进制造国家工程研究中心，上海 201203；2. 华东理工大学生物工程学院，上海 200237）

摘要：外泌体作为一种新型生物物质，具有特异性、呈递性、促瘤性、脱免性及诱导性等特征，正在被广泛开发应用于临床医学领域。然而，外泌体的具体分子机制尚未明确。此外，由于外泌体的不良反应还不明确，权衡好外泌体的利害关系是有效利用外泌体进行治疗及诊断的关键。为了实现产业化生产应用，需简化及改进外泌体的分离、提取技术，提高产量，降低成本，这将成为外泌体生产的核心研究方向。该研究总结了外泌体的基本信息以及生物学功能特征，并归纳介绍了外泌体的工程化制备流程，在此基础上整理相关企业在外泌体领域的技术与产品，为深入探索外泌体的应用潜力提供参考。

关键词：外泌体；工程化；临床医学；应用；分离；纯化
中图分类号：R945　　**文献标志码**：A　　**文章编号**：1001-8255(2023)07-1008-12
DOI：10.16522/j.cnki.cjph.2023.07.004

Biological Properties and Application Overview of Exosomes

SHI Yuxiao[1,2], LU Xiaohong[1], LU Wangding[1*], LUO Huafei[1*]
(*1. National Advanced Medical Engineering Research Center, China State Institute of Pharmaceutical Industry, Shanghai 201203; 2. Institute of Bioengineering, East China University of Science and Technology, Shanghai 200237*)

ABSTRACT: As a new biological material, exosomes have the characteristics of specificity, presentation, tumor-promoting, immune escape and induction, which are being widely used in clinical medicine. However, the specific molecular mechanism has not yet been clarified. Due to the unclear side effects of exosomes in functional applications, balancing the interests of exosomes is the key to use exosomes for treatment and diagnosis effectively. At the same time, it is necessary to simplify and improve the separation and extraction technologies of exosomes, increase production and reduce costs in order to realize the industrial production and application. It is a core to find a way to obtain high purity specific exosomes and ensure production supply. In this manuscript, the basic information, the biological function characteristics of exosomes, and the preparation process of engineering exosomes are summarized. In addition, the technologies and products from relevant commercial companies in this filed are sorted out, which provides insights to further explore the application of exosomes.

Key Words: exosome; engineering; clinical medicine; application; separation; purification

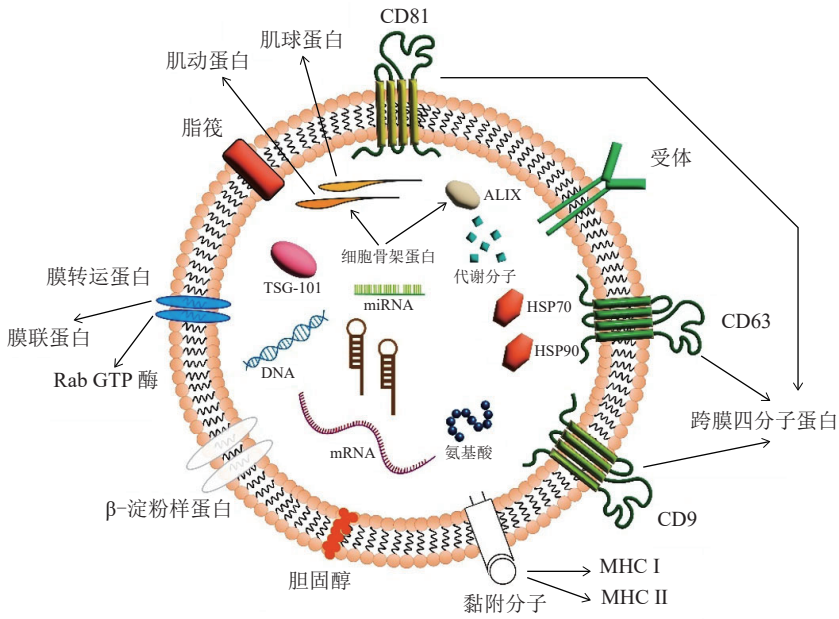
外泌体（exosomes）是细胞分泌到胞外的一种盘状天然囊泡，属于细胞外囊泡的一种。所有活细胞均可分泌外泌体，因此外泌体广泛存在于细胞培养上清液以及各种体液中，包括血液、淋巴液、唾液、尿液、乳汁等，同时也存在于组织样本中。外泌体中有丰富的内容物［包括DNA、信使RNA(mRNA)、微RNA(microRNA，miRNA)、各种蛋白质、脂质等］，且不同细胞在不同状态下分泌的外泌体中的内容物不同，如肿瘤细胞衍生的外泌体内容物中还包括酶、转录因子、代谢分子、跨膜四分子蛋白等（图1）[1]。细胞受到外在刺激（如

收稿日期：2021-12-22
作者简介：史玉潇(2002—)，男，华东理工大学生物工程学院2020级本科生，医药先进制造国家工程研究中心实习生。
通信作者：卢望丁(1990—)，女，博士，从事经皮制剂以及吸入制剂的研发。
E-mail：luwangding@163.com
罗华菲(1977—)，女，博士，研究员，博士生导师，从事经皮药物递送与新型黏附技术的研究。
E-mail：luohuafei01@sinopharm.com

低氧、氧化应激、剪应力等）会导致外泌体释放增加，细胞内因子的改变也会影响外泌体的释放，其中包括细胞质钙离子的增加和细胞骨架的降解[2]。外泌体参与机体免疫应答、抗原提呈、免疫逃逸、肿瘤侵袭等生理活动，可被应用于免疫调控和疾病的诊疗。本研究介绍了外泌体及其生物学功能特征，重点归纳了工程化外泌体的制备工艺，并整理了相关企业在外泌体领域的技术与产品，以期为深入探索外泌体的应用潜力提供文献参考。

1 外泌体的研究进展与产生机制

外泌体在 20 世纪 60 年代被首次报道[3]。1983 年 JOHNSTONE 等[4]在绵羊网织红细胞体外成熟过程中首次观测到外泌体，并研究了其与质膜活性的关系，证明在回膜成熟过程中形成的每个囊泡都具有多种等离子膜功能[5]，且外泌体释放是陈旧膜蛋白外化的主要途径[6]。1996 年，RAPOSO 等[7]在 B 淋巴细胞中也观测到了外泌体，结果显示其中包含 MHC Ⅱ类分子，且这些外泌体具有刺激 T 细胞增殖、抑制肿瘤生长等重要生物学活性。2014 年，有研究[8]报道在体外培养的不同类型细胞［如树突细胞（DC）、上皮细胞、肿瘤细胞、间充质干细胞（MSCs）等］中也检出了外泌体[8]。研究[9]显示，外泌体不仅包含细胞正常的代谢产物，而且普遍具有细胞功能。因此，研究者聚焦于探究外泌体对肿瘤疾病进程的影响机制，并利用外泌体进行适当的干预治疗。外泌体的形成主要包括细胞内吞、内容物分选转运等过程，涉及多种蛋白质分子（图 2[10]）。首先分泌细胞的细胞膜发生内吞作用，内陷形成胞内小泡，小泡表面含有转铁蛋白受体，形成早期外泌体，进一步发展为多泡小体，通过内吞体分选转运复合体（endosome sorting transport complex，ESCRT）向细胞膜移动，途中接收 RNA 及细胞质蛋白质并内部酸化发育形成晚期外泌体。晚期外泌体中的微粒体膜再向内“出芽”形成多囊泡内体；在多种机制的共同作用下，向外定向输出的多囊泡内体与细胞膜发生融合，其内部形态和大小均一的囊泡通过胞吐作用被释放到细胞外，形成 30～150 nm 的外泌体。外泌体可通过体液在体内转运。针对受体细胞，外泌体主要有 3 种途径进行胞间信号交流与物质传递：一是外泌体膜蛋白可以与受体



ALIX—凋亡连接基因 2（ALG-2）相互作用蛋白；CD9、63 和 81—分化族 9、63 和 81；HSP70 和 90—热休克蛋白 70 和 90；MHC Ⅰ和Ⅱ—主要组织相容性复合体Ⅰ和Ⅱ；TSG-101—肿瘤易感基因 101。

图 1 肿瘤细胞分泌的外泌体示意图

Fig.1 Schematic Diagram of Exosomes Secreted by Cancer Cells

细胞膜蛋白结合，进而激活受体细胞内的信号通路，进行细胞内吞摄取；二是在细胞外基质中，外泌体膜蛋白可被蛋白酶剪切，剪切的碎片可作为配体与细胞膜上的受体结合，激活细胞内的信号通路；三是外泌体膜可与受体细胞膜直接融合，非选择性地释放其所含的蛋白质、mRNA 以及 miRNA。

2　外泌体的生物学应用以及相关产品

2.1　特异性及医学诊断应用

不同细胞分泌的外泌体数量、细胞膜与内容物成分、生物学功能都有所不同，具有特异性；外泌体的大小和含量可反映分泌细胞的类型和状态，并能精准调控机体内的各种生理活动，可作为生物标志物用于疾病诊断。通过分离、提纯体液中的外泌体，分析其内含的特征 miRNA 或蛋白质等，再通过与疾病特征标志物进行比对就能判断疾病类型 [10—12]。有研究提出了一种新的基于多视角内核融合网络的预测方法（MvKFN-MDA）来更好地整合 miRNA 和疾病的相似性信息，推断出 miRNA 与疾病之间的潜在关联 [13]，这为利用外泌体对疾病进行间接诊断提供了新工具。在阿尔茨海默病（AD）的诊断中，有研究 [14—16] 证实外周循环中神经系统来源的外泌体与脑脊液中 β- 淀粉样蛋白（Aβ1-42）、微管相关蛋白（T-Tau 和 P-Tau）的表达水平具有高度相关性，是进行 AD 早期或中期诊断的重要依据。此外，通过检测外泌体内容物中的 microRNA-92a-3p（在缺血性心脏病患者中大量表达）也可进行医学诊断 [17]。2021 年，DAI 等 [18] 构建了一种基于尿液上皮细胞黏附分子（EpCAM）-CD9 阳性细胞外囊泡的多因素诊断模型，用于前列腺癌诊断时可高灵敏度地定量检测尿液中微量的肿瘤来源细胞外囊泡。该模型将大大提高前列腺癌诊断的特异性和敏感度，并且因尿液标本获取方便、无创等优势，可减轻患者痛苦、避免传统穿刺活检法因取样随机性而产生的假阴性结果。

不同细胞来源的外泌体成分特异、功能特异，可特异性识别受体细胞 [19]。例如，血小板来源的外泌体能识别内皮细胞和巨噬细胞，却不能识别中性粒细胞；而中性粒细胞来源的外泌体则可识别血小板。

外泌体与分泌细胞具有类似的膜组分与内容物组分。通过超速离心法可得到纯化的外泌体，再将其裂解、释放出内容物，然后通过检测 miRNA 与蛋白质等特征物质可诊断疾病。表 1 列举了近年来基于外泌体的疾病诊断产品。

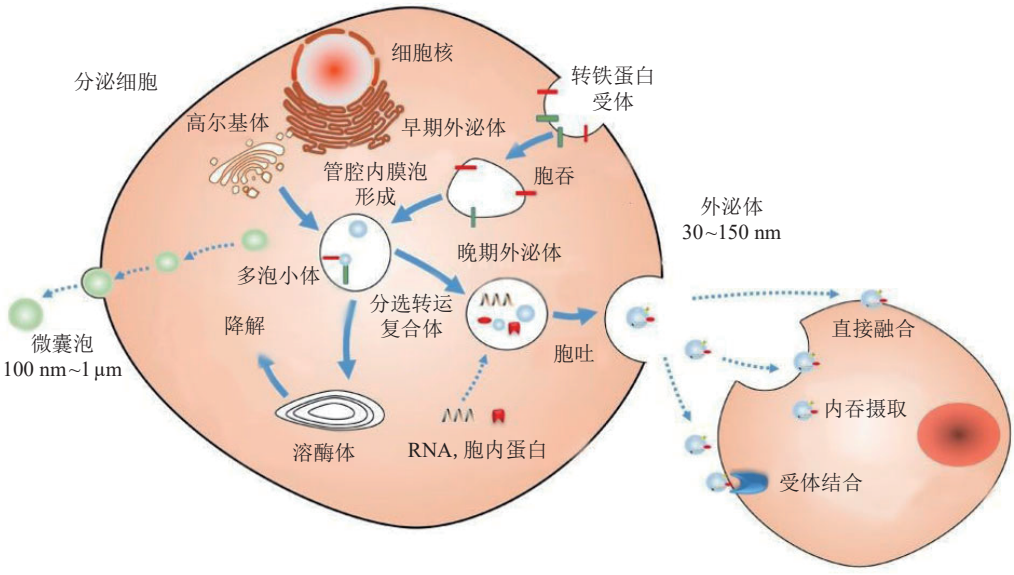


图 2　外泌体的产生过程与作用机制 [10]

Fig.2　Formation Process and Function Mechanism of Exosomes [10]

2.2 呈递性及免疫调控应用

外泌体一般通过传递多种生物分子完成抗原呈递、免疫活化抑制及免疫耐受过程。其中，抗原呈递细胞分泌的外泌体能携带并呈递相关复合物，通过减弱或增强免疫反应达到免疫治疗的目的[20]。此外，外泌体还装载着诸多免疫相关分子，包括溶酶体相关膜蛋白 1 和 2、免疫球蛋白超家族成员 8 及 MHC[21]，可特异性结合相关肽链、诱导免疫应答。

1998 年，ZITVOGEL 等[22] 研究了 DC 外泌体在免疫应答方面的作用，结果显示产生的外泌体可引起小鼠的肿瘤排斥反应。有研究[23] 表明，哮喘患者的气道外泌体含量和活性与健康人群不同，髓源性抑制细胞通过外泌体将线粒体转移至 T 细胞，说明外泌体可能介导重要的免疫调节作用。其中，具代表性的是 MSCs 来源的外泌体。 MSCs 具有良好的再生潜力，其分泌的细胞外囊泡、外泌体等能抑制细胞纤维化与凋亡，促进细胞存活分化[24]。MSCs 来源的外泌体可对固有免疫应答、适应性免疫应答、抗原提呈等生物学过程进行免疫调控（如图 3 所示）[25]。

综上所述，外泌体能呈递多种复合物，增强或减弱机体免疫反应，可用于调节过度免疫（自身免疫性疾病）和免疫不足（免疫缺陷病）。外泌体通过呈递激活性受体或抑制性受体进行免疫调控，如图 4 所示。

若将外泌体作为药物载体保护并递送抗肿瘤药，可使之同时具备免疫调控和抗肿瘤的功能。已有一些基于外泌体的免疫调控、肿瘤治疗相关产品处于研发中，如表 2 所示。

2.3 脱免性及药物递送载体应用

外泌体免疫原性低，可逃逸大部分免疫系统的识别和攻击。相较于传统化学药物的生物相容性差、易被人体清除、溶解度及渗透性差等缺点[27]，外泌体具有诸多优势：纳米尺度的体积、低细胞毒性、良好的生物膜透膜性和生物相容性，且其脂质双层膜结构可保护内容物不被降解、维持生物活性。因此，外泌体可作为载体递送药物，帮助药物逃逸免疫系统、跨越组织屏障，提高药物递送和吸收效率[28]。

此外，外泌体若经过特殊改造，能延长循环半衰期及稳定性，获得器官靶向性，但靶向机制尚不清楚[29]。国内外研究者用生物工程技术对外泌体进行靶向肽修饰，以增强靶向给药功能。常见的策略有 2 种：一种是借助基因工程对供体细胞进行靶向肽基因修饰，分泌表面具有靶向肽的外泌体[30]；另一种是将靶向肽直接与外泌体双层膜偶联或结合，如利用肝癌靶向肽修饰肝癌细胞来源的外泌体以靶向肿瘤组织。将噬菌体肽段（CP05）与 CD63（一种外显性表面蛋白）结合，能定位、装载和捕获不同来源的外泌体[31—32]。2021 年，WANG 等[33] 开发了一种装载多柔比星（DOX）的嗜中性粒细胞 - 外泌体（Nes-Exos）系统，可响应炎症刺激，从而靶向至炎症性脑肿瘤部位，克服传统疗法的局限性。

表 3 汇总了目前处于研发中的外泌体载药产品，显示了外泌体载药体系的良好商业化前景。

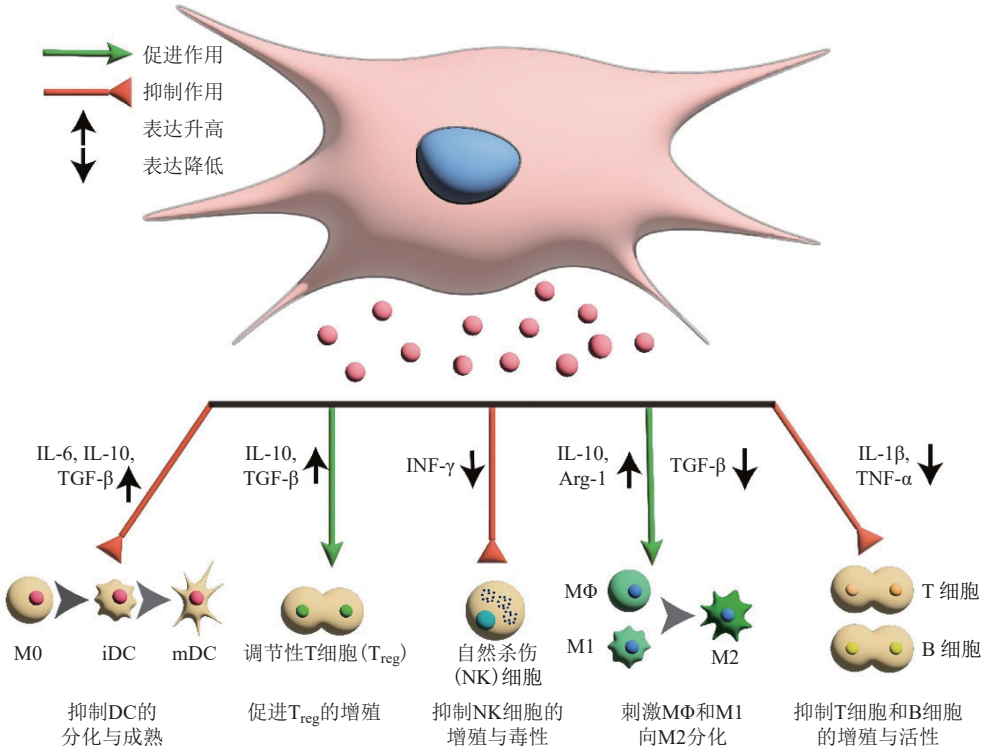
2.4 促瘤性及肿瘤治疗应用

肿瘤细胞来源外泌体的促瘤性表现为在调节机体免疫功能的同时，也会向受体细胞传递有害信息，导致细胞病变[34]；并且，肿瘤细胞还会通过分泌外泌体将一部分药物排出细胞或与功能性药物抗体结合，降低药效、产生耐药性[35]。经证明，在具有氧化磷酸化依赖性的乳腺癌中，来自细胞外囊泡

表 1 基于外泌体的疾病诊断产品

Tab.1 Products for Diagnosis Based on Exosomes

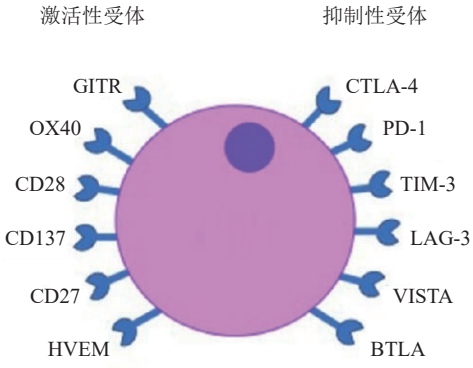
公司	应用方向	相关产品	研发阶段
Exosome Diagnostics	前列腺特异性外泌体来源的 RNA 生物标志物	EPI-CE 试剂盒	商业化应用
	基于尿液的前列腺癌诊断	ExoDx Prostate（IntelliScore）	商业化应用
	基于血浆的肺癌 EML4-ALK 融合基因突变诊断	ExoDx Lung（ALK）	商业化应用
Exosomics	肿瘤特异性 mRNA 变异的检测	LB-SeleCTEV Kit（EGFR）	仅供研究使用
NX PharmaGen	产前诊断和肿瘤诊断	NeXosome	仅供研究使用
NanoSomiX	基于神经元外泌体的脑部疾病诊断	ExoM & ExoC	仅供研究使用



IL-6—白细胞介素 6；IL-10—白细胞介素 10；TGF-β—转化生长因子 -β；INF-γ—干扰素 γ；Arg-1—精氨酸酶 1；IL-1β—白细胞介素 -1β；TNF-α—肿瘤坏死因子 α。

图 3　MSCs 来源外泌体的免疫调控

Fig.3　Immunoregulation of MSCs-derived Exosomes



GITR—糖皮质激素诱导的肿瘤坏死因子受体；OX40—肿瘤坏死因子受体超家族成员 4 受体；CD28—分化簇 28；CD137—4-1BB 因子；CD27—分化簇 27；HVEM—疱疹病毒侵入介体；CTLA-4—细胞毒性 T 淋巴细胞相关蛋白 4；PD-1—程序性死亡受体 1；TIM-3—T 细胞免疫球蛋白和黏蛋白结构域分子 -3；LAG3—淋巴细胞活化基因 3；VISTA—T 细胞活化的 V 结构域 Ig 抑制因子；BTLA—B/T 淋巴细胞弱化因子。

图 4　T 细胞上的激活性受体和抑制性受体 [26]

Fig.4　Activating Receptors and Inhibitory Receptors on T Cells[26]

的线粒体 DNA（mtDNA）作为致癌信号可诱导肿瘤干细胞活化，诱发肿瘤 [36]。诸多研究表明，晚期肿瘤细胞分泌的外泌体可抑制抗肿瘤的免疫应答，促进肿瘤的生长与扩散。

近年来，外泌体在肿瘤治疗应用方面产生了诸多新的干预措施，如阻止外泌体的生成、分泌和阻断外泌体介导的细胞通信 [37]。研究 [38] 表明，外泌体能与肿瘤抑制因子相互作用，通过阻断细胞存活所必须的信号通路，来抑制肿瘤的增殖与扩散。有研究 [39] 通过构建载有 DOX 和 2- 脱氧 -D- 葡萄糖的稀土纳米颗粒，并配合抗程序性细胞死亡配体 1（PD-L1）抗体治疗，实现了对原位和转移性肿瘤的精准靶向成像及化疗辅助免疫治疗。

外泌体可用于靶向药物递送，但因携带其他与肿瘤生长、发展和转移的相关基因 [40]，仍存在一些潜在风险。因此，如何权衡外泌体的免疫调控作用和诱导肿瘤扩散作用是利用外泌体进行肿瘤治疗

表 2 免疫调控相关的外泌体产品

Tab.2 Exosome Products for Immune Modulation

公司	应用方向	相关产品	研发阶段
Codiak BioSciences	恶性肿瘤、免疫疾病、神经退行性疾病	engEx 平台：利用 2 种基架蛋白精确地将各种蛋白质引导到表面或外泌体内腔，形成外泌体药物，主动靶向到抗原呈递细胞，驱动和增强人体免疫系统的免疫应答	核心技术开发阶段
Exogenus Therapeutics	皮肤病变、炎症前期、自身免疫疾病	ExoWound [1)]：将 Exo-101 包封在一种在体温下能固化的缓释水凝胶中，减少促炎基因的表达，增加巨噬细胞相关抗炎因子的产生	临床前验证阶段

注：[1)]ExoWound同时是一款外泌体载药产品。

表 3 外泌体载药相关产品

Tab.3 Products of Drug-loading Exosomes

公司	疾病	相关产品	研发阶段
Codiak BioSciences	皮肤 T 细胞淋巴瘤、黑色素瘤、乳腺癌	exoIL-12：通过专有蛋白支架，在表面以完全活性的形式呈现白细胞介素 -12（IL-12），增强免疫效应细胞的作用	临床Ⅰ期
	实体瘤（头颈部鳞癌、乳腺癌等）	exoSTING：利用 engEx 平台使外泌体携带干扰素基因激动药，并在表面表达相关蛋白，促进抗原提呈细胞的特异性摄取	临床Ⅰ期
	肝细胞性肝癌、胰腺导管腺癌、结直肠癌等	exoASO-STAT6：在外泌体表面携带特定的反义寡核苷酸，降低免疫抑制转录因子的表达，激活巨噬细胞，促进抗肿瘤免疫反应	临床Ⅰ期

的研究重点。

2.5 诱导性及再生医学应用

外泌体还具有诱导细胞分裂和分化的功能，可促进MSCs分化为不同细胞以替代受损的组织细胞，应用于再生医学领域。

MSCs 产生的外泌体对关节软骨再生起重要作用。体外试验表明，人华通胶来源的 MSCs 分泌的外泌体可促进骨髓间充质干细胞的迁移、增殖及软骨细胞增殖[41]。不仅如此，在某些疾病治疗中，MSCs 来源的外泌体相较于 MSCs 本体有更好的作用[42]。

神经细胞来源的外泌体有突触可塑性、神经回路发育、神经血管通信、神经元 - 胶质接口、神经保护、神经再生和传播神经病理分子等功能特性；MSCs 来源的外泌体可促进神经干细胞在体外和体内的迁移，这有利于将内源性神经干细胞集中到脊髓损伤区。在此基础上，ZHANG 等[43]近期研发了一种胶原生物支架，可有效地将 MSCs 来源的外泌体保留在支架内，向损伤部位募集内源性神经干细胞，同时利用紫杉醇引导神经干细胞向神经元分化，表现出较好的促进神经再生性能。

此外，脂肪间充质干细胞来源的外泌体能刺激成纤维细胞的增殖、迁移和胶原蛋白合成，并促进多种蛋白、胶原、抗原的表达，从而促进皮肤伤口愈合（图 5）[44]。从人脐带间充质干细胞的条件培养液中提取的外泌体可促进细胞的增殖及迁移，抑制线粒体凋亡信号通路，从而促进皮肤创面的修复[45]。2021 年，有研究[41]将人华通胶来源的 MSCs 分泌的外泌体与无细胞软骨细胞外基质支架相结合，用于修复骨软骨缺损，并解释了外泌体促进骨软骨再生的机制，为临床软骨再生治疗方法提供了思路。利用纯化的血小板外泌体产物也能使具有正常生物力学特性的健康皮肤再生，不生成疤痕组织[46]。值得一提的是，该技术可进行严格的质量控制，并且制成的干粉使用方便、在室温下可长期保存。

外泌体具有诱导细胞增殖分化的功能，且来源丰富、易于获取、便于贮存、移植后不易诱发免疫排斥反应，在再生医学领域的应用潜力巨大；然而，该领域不适宜采用肿瘤细胞来源的外泌体。抑制不利外泌体的生成与传递、促进有利外泌体的分泌与递送，是研究者未来重要的研究方向。

许多公司已研发出基于外泌体的再生医学产品，涵盖伤口再生、药妆产品等领域（表 4）。

3 外泌体工程化技术

外泌体工程化技术涉及从生产到分离纯化、工程化改造、保存运输，以及临床应用的整个流程。以 EVerZom 公司的 MSCs 来源外泌体工程化生产为例，首先进行外泌体扩大培养，在介质中重悬浮、

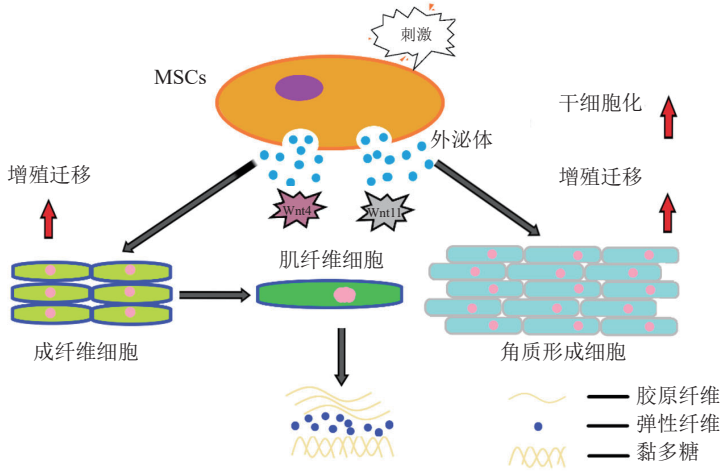


图 5　MSCs 来源的外泌体促进皮肤损伤修复

Fig.5　Rejuvenation of Scarring Promoted by MSCs-derived Exosomes

表 4　基于外泌体的再生医学产品

Tab.4　Products Based on Exosomes for Regenerative Medicine

公司	应用方向	相关产品	研发阶段
Aegle Therapeutics	大疱性表皮松解症（DEB）或烧伤治疗，以及高质量外泌体的纯化分离	AGLE-102：分离出 MSCs 来源的细胞外囊泡的合成物，利用其中的Ⅶ型胶原蛋白（DEB 患者缺陷的蛋白质）来加速伤口愈合	临床Ⅰ/Ⅱa期
		AGLE-103：携带 MSCs 的再生伤口愈合信息并向患病细胞提供相应 mRNA，将其递送至无法产生它的 DEB 患者皮肤细胞	临床Ⅰ期
ExCoBio	基于干细胞来源外泌体的创新生物药物和药妆品	ASCE+：将源于干细胞培养液的外泌体成分冷冻干燥，其含有的细胞因子等成分具有肌肤再生及抗炎效果	商业化生产
		EXOMAGE：通过 ExoBRID 专利技术（可生产高纯度外泌体）萃取而成，能促进细胞再生和修复，从而激活肌肤休眠状态的表皮干细胞	商业化生产

离心后取沉淀进行药物装载，再离心、纯化、工程化改造、过滤除菌，得到产品，最后进行贮存和运输，留待临床应用（流程如图 6 所示）。

3.1　外泌体的生产放大

在工程化生产外泌体的过程中，由于分离和纯化难度较大，故外泌体的产量在一定程度上决定着临床应用的广泛性。目前情况下，细胞外泌体的分泌量并不能满足工业化需求，所以工程化流程迫切需要进行外泌体的放大化生产。研究表明，缺氧、饥饿、氧化应激、剪应力、加热、电刺激等处理都会增加外泌体产量[2]。

例如，使用无外泌体血清培养相较于无血清培养更适合结肠癌细胞来源外泌体的生成，更接近生理条件下的生长环境，外泌体分泌量更多[47]。细胞纳米穿孔可使多泡体的形成数量翻倍、胞内小泡的生成增加 8 倍。电刺激可促进钙离子进入细胞，诱导外泌体释放；也可能会诱发热休克反应，促进 p53-TSAP6 信号转导，导致外泌体产量提高。此外，一些物理手段如剪应力等，也可促进外泌体产生，但需要投入大量物力和人力，不适于工业生产。GUO 等[48]在生物反应器中培养了含有干细胞或肌肉细胞的组织，用于流动刺激或机械拉伸，受刺激的组织产生的胞外囊泡比静态对照组多 37 倍，证明细胞在外力刺激下更易分泌外泌体。

3.2　外泌体的分离与纯化

在外泌体的工程化生产中，如何确保外泌体分离的通量、产出量和纯度是关键。由于外泌体来源广泛，原料通常以体液形式提供，其中混有核酸和蛋白等杂质，故需要分离、纯化处理。分离策略主要包括基于与表面表达物结合的捕捉技术、基于多孔膜的筛分技术以及基于筛分结构的捕集技术、基于光学可极化特性的光镊方法、超声共振分离手

段、介电电泳、电泳、流式细胞分选及磁分选等[49]。表 5 列举了一些常见的外泌体分离方法，并比较了优缺点。

超速离心法被认为是目前外泌体分离与浓缩的较佳方法[50]。在传统方法的基础上，利用微流控技术可将外泌体的分离、回收、检测等多种操作整合至微米级别的芯片上进行，兼容了多种外泌体分离方法；该法具有微型化、自动化和集成化等优势，能够为细胞外囊泡的捕获和解析提供一个高通量、高开放性和高稳定性的、从样本到结果的技术平台[51]。

有一种崭新的思路值得一提，即通过阴离子交换色谱柱大规模纯化高性能外泌体。目前已有试验证明该法的去蛋白率超过 99.97%[52]，并且适用于大规模分离和纯化，较适合临床应用中功能性外泌体的制备。

3.3 外泌体的工程化改造

3.3.1 特异性靶向肽改造

前述可直接或间接使外泌体膜携带靶向肽而使其获得器官靶向性。OHNO 等[53]将能与表皮生长因子受体（EGFR）特异性结合的 GE11 肽对应的基因片段插入到相应载体上，随后将其转染到胚肾细胞（HEK293 细胞）中，成功地在分离的外泌体膜上表达了 GE11 肽；该外泌体可主动靶向至表达 EGFR 的乳腺癌细胞，释放 miRNA 而抑制肿瘤生长。

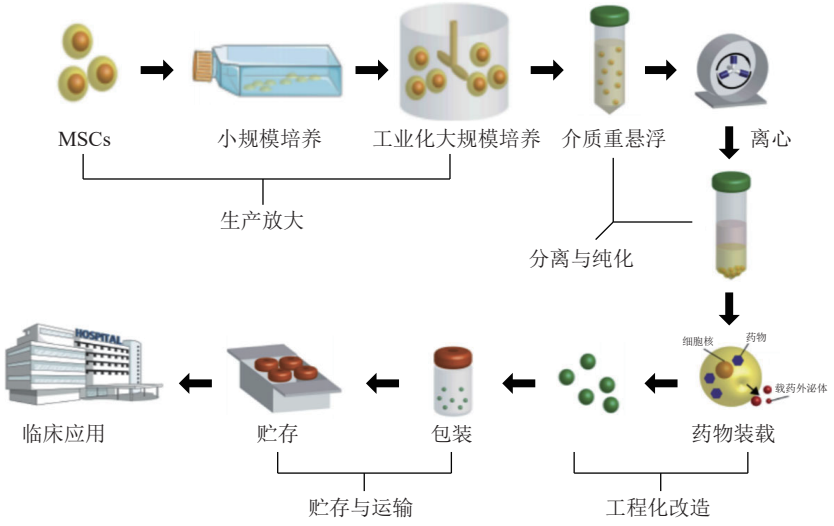


图 6 MSCs 来源外泌体的工程化流程图

Fig.6 Flow Chart of Engineering Exosomes Derived from MSCs

表 5 外泌体分离方法的比较

Tab.5 Comparison of Separation Methods of Exosomes

分离方法	原理	用时	纯度	产量	优点	缺点
超速离心	质量密度	长	中等	中等	方法简单，不会引入其他的标志物	可能会破坏外泌体，操作烦琐，费时费力
密度梯度离心	质量密度	长	高	低	方法简单，不会引入其他的标志物	产量低，强力可能破坏外泌体
分子排阻	尺寸	中等	高	中等	外泌体纯度相对较高，且外泌体结构不易受到破坏	有一些大小相近的颗粒也会被分离出来
超滤	尺寸	短	中等	低	操作方便，富集效率高，且成本较低	膜易变形，膜孔易堵塞，外泌体纯度较低，大颗粒蛋白污染严重，导致外泌体回收量减少
磁珠特异性捕捉	表面标志物的特异性结合	短	高	低	外泌体纯度较高，并且对外泌体膜结构影响较小	成本较高，无法进行大剂量的提取
聚合物沉降	聚合物富集	长	低	高	外泌体产量较多	杂质含量较多
微流控技术	结合声波、介电电泳等物理特性进行分离	短	高	低	回收率和纯度高，耗时短，生物相容性好	低通量，需要较高的精密制造技术

3.3.2 外泌体内容物改造

通过工程化技术可使外泌体的内容物发生改变来实现药物装载，形成功能特异性的外泌体；随后利用外泌体的脱免性保护药物，实现药物的低免疫原性递送。目前外泌体的药物装载方法主要分为三类：前装载、后装载、供体修饰装载。前装载是将药物加载到供体细胞中，在外泌体形成过程中包裹药物，主要有转染、联合培养分泌等方法。SUN 等[54]利用前装载法实现了外泌体对姜黄素的被动装载。后装载是在供体细胞产生外泌体后进行药物装载，主要有电穿孔、超声、挤出、反复冻融等。ALVAREZ-ERVITI 等[55]通过施加外部电场在纯化的外泌体上形成亲水孔，用以装载小干扰 RNA（siRNA）。供体修饰装载主要是通过生物工程修饰供体细胞来实现。研究者通过基因工程将人抗原 R（human antigen R，HuR）与 CD9 基因序列融合后修饰供体细胞，得到了具有融合蛋白 HuR-CD9 的外泌体，使其能主动提高 RNA 的装载量[56]。

有研究[57]提出了一种新方法，即通过光学可逆蛋白 - 蛋白质相互作用来修饰外泌体，所得的外泌体作为一种新型的蛋白质载体，能通过控制光照来控制药物的装载与释放过程。

CRISPR/Cas9 基因编辑和调控技术是目前的研究热点之一。研究人员发现脂质体不能单独转染至 MSCs 中，而将脂质体与 CRISPR/Cas9 表达载体结合后再装载入外泌体，就可被 MSCs 吞噬并表达。这项技术为将治疗性物质装载入外泌体提供了新的思路[58—59]。

4 外泌体的贮存与运输

工程化外泌体分离后需要贮存和运输，而外泌体的生物活性可能受到保存介质、保存温度和保存时间等因素的影响，因而需要优化贮存与运输手段。常用的保存方法是冷冻法，但冷冻处理可能会导致囊泡聚集，改变外泌体的形状与物理性质，且运输途中反复冻融会导致外泌体表面标志物的生物特性、含量和组成发生变化[60]。－80 ℃被公认是适宜保存生物标本的温度[61]，但在贮存和运输的过程中很难达到。4 ℃下贮存虽然可能会损失外泌体中的蛋白质和核酸，但可避免反复冻融过程造成的囊泡破坏[60]。冻干法是保存外泌体的另一种方法[62]，在冷冻过程中使用海藻糖作保护剂，可稳定蛋白质并减少冷冻过程中冰晶的形成，减少分离和保存过程中细胞外囊泡的损失等[63]。值得注意的是，不同来源的外泌体因其异质性，即使在相同环境下保存，稳定性可能会大有不同。因此，不同细胞来源的外泌体应根据其特性采用不同的贮存和运输方法[64]。

5 外泌体应用于临床的主要限制

首先，虽然外泌体在 20 世纪就已被发现，但其作用的具体分子机制尚未明确。例如，近年有很多文献报道了外泌体对突触可塑性的影响，有望用于治疗 AD，但具体机制不明确，推测是基于促进神经细胞分泌外泌体、增强外泌体功能、激活外泌体下游相应的生物功能等作用。

其次，外泌体的分离和纯化效率也限制了其临床应用。目前通用的超速离心法还有诸多改进空间，许多公司已推出了外泌体分离、纯化及量产的专利方法，形成了技术壁垒。简化、改进外泌体的分离、提取技术，以及提高产量、降低成本，是外泌体产业化应用的前提。因此，发展既能得到高纯度、特异性的外泌体，又能确保产量供应的方法，是外泌体生产的核心研究方向。

最后，外泌体的不良反应尚不明确，也限制了其功能性应用。研究外泌体的生物分布、毒性、血栓形成和半衰期等是有效利用外泌体进行治疗和诊断的关键。目前有多家公司正在进行临床试验，但绝大多数正处于临床Ⅰ期或Ⅰ/Ⅱ期。在尝试控制外泌体不良反应的前提下，推动外泌体的临床试验有利于探究外泌体的诊断、治疗效果及长期影响。

6 总结与展望

外泌体具有特异性、抗原呈递性、促瘤性、脱免性及免疫诱导性等特征，可应用于医学诊断、免疫调控、肿瘤治疗、药物载体、再生医学等领域。外泌体作为新型生物物质，应用前景光明、潜力巨大。然而，外泌体的产生及作用机制仍需要深入了解，以指导其治疗和诊断上的应用。本研究列举的

大部分产品目前还停留在试验阶段，需要研究者们深入研究外泌体的产生和作用机制，并权衡不良反应和收益，稳步推进产品研发进程。如何精细调控外泌体的产量、提高分离和纯化效果、进行工程化加工改造、开辟临床应用新思路将是后续的研究方向。

综上所述，随着外泌体分子机制以及作用机制的逐渐明确，其诊断与治疗潜力将会被更深入地进行发掘，不仅可进行疾病诊断、个性化预测，还可用于疫苗开发与免疫治疗、基因治疗、靶向治疗等，在精准医疗上有着光明的应用前景，产业化的外泌体产品或将成为临床治疗的主力军。

参考文献：

[1] MILANE L, SINGH A, MATTHEOLABAKIS G, *et al*. Exosome mediated communication within the tumor microenvironment [J]. *J Control Release*, 2015, **219**: 278-294.

[2] TURTURICI G, TINNIRELLO R, SCONZO G, *et al*. Extracellular membrane vesicles as a mechanism of cell-to-cell communication: advantages and disadvantages [J]. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2014, **306**(7): C621-C633.

[3] WOLF P. The nature and significance of platelet products in human plasma [J]. *Br J Haematol*, 1967, **13**(3): 269-288.

[4] JOHNSTONE R M, ADAM M, HAMMOND J R, *et al*. Vesicle formation during reticulocyte maturation. Association of plasma membrane activities with released vesicles (exosomes) [J]. *J Biol Chem*, 1987, **262**(19): 9412-9420.

[5] JOHNSTONE R M, BIANCHINI A, TENG K. Reticulocyte maturation and exosome release: transferrin receptor containing exosomes shows multiple plasma membrane functions [J]. *Blood*, 1989, **74**(5): 1844-1851.

[6] JOHNSTONE R M, MATHEW A, MASON A B, *et al*. Exosome formation during maturation of mammalian and avian reticulocytes: evidence that exosome release is a major route for externalization of obsolete membrane proteins [J]. *J Cell Physiol*, 1991, **147**(1): 27-36.

[7] RAPOSO G, NIJMAN H W, STOORVOGEL W, *et al*. B lymphocytes secrete antigen-presenting vesicles [J]. *J Exp Med*, 1996, **183**(3): 1161-1172.

[8] YU B, ZHANG X, LI X. Exosomes derived from mesenchymal stem cells [J]. *Int J Mol Sci*, 2014, **15**(3): 4142-4157.

[9] VLASSOV A V, MAGDALENO S, SETTERQUIST R, *et al*. Exosomes: current knowledge of their composition, biological functions, and diagnostic and therapeutic potentials [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2012, **1820**(7): 940-948.

[10] JIA Y, CHEN Y, WANG Q, *et al*. Exosome: emerging biomarker in breast cancer [J]. *Oncotarget*, 2017, **8**(25): 41717-41733.

[11] 李 晓, 刘玲英, 柴家科. 外泌体的生物学特性及临床应用的研究进展[J]. 解放军医学院学报, 2015, **36**(10): 1042-1044.

[12] CHEN X, XIE D, ZHAO Q, *et al*. MicroRNAs and complex diseases: from experimental results to computational models [J]. *Brief Bioinform*, 2019, **20**(2): 515-539.

[13] LI J, LIU T, WANG J, *et al*. MvKFN-MDA: multi-view Kernel Fusion Network for miRNA-disease association prediction [J]. *Artif Intell Med*, 2021, **118**: 102115.

[14] BLENNOW K. Cerebrospinal fluid protein biomarkers for Alzheimer's disease [J]. *NeuroRx*, 2004, **1**(2): 213-225.

[15] TAPIOLA T, ALAFUZOFF I, HERUKKA S K, *et al*. Cerebrospinal fluid {beta}-amyloid 42 and tau proteins as biomarkers of Alzheimer-type pathologic changes in the brain [J]. *Arch Neurol*, 2009, **66**(3): 382-389.

[16] COUNTS S E, IKONOMOVIC M D, MERCADO N, *et al*. Biomarkers for the early detection and progression of Alzheimer's disease [J]. *Neurotherapeutics*, 2017, **14**(1): 35-53.

[17] LIU Y, LI Q, HOSEN M R, *et al*. Atherosclerotic conditions promote the packaging of functional microRNA-92a-3p into endothelial microvesicles [J]. *Circ Res*, 2019, **124**(4): 575-587.

[18] DAI Y, WANG Y, CAO Y, *et al*. A multivariate diagnostic model based on urinary EpCAM-CD9-positive extracellular vesicles for prostate cancer diagnosis [J]. *Front Oncol*, 2021, **11**: 777684.

[19] 卢 婉, 杨人强, 王 伶. 外泌体的研究进展[J]. 生命的化学, 2013, **33**(4): 438-442.

[20] ELAHI F M, FARWELL D G, NOLTA J A, *et al*. Preclinical translation of exosomes derived from mesenchymal stem/stromal cells [J]. *Stem Cells*, 2020, **38**(1): 15-21.

[21] 许亚辉, 胡素芹, 郭 健. 外泌体通过 Toll 样受体调节固

有免疫的研究进展[J]. 中国免疫学杂志, 2021, **37**(21): 2584-2591.

[22] ZITVOGEL L, REGNAULT A, LOZIER A, *et al*. Eradication of established murine tumors using a novel cell-free vaccine: dendritic cell-derived exosomes [J]. *Nat Med*, 1998, **4**(5): 594-600.

[23] HOUGH K P, TREVOR J L, STRENKOWSKI J G, *et al*. Exosomal transfer of mitochondria from airway myeloid-derived regulatory cells to T cells [J]. *Redox Biol*, 2018, **18**: 54-64.

[24] TEIXEIRA F G, CARVALHO M M, NEVES-CARVALHO A, *et al*. Secretome of mesenchymal progenitors from the umbilical cord acts as modulator of neural/glial proliferation and differentiation [J]. *Stem Cell Rev Rep*, 2015, **11**(2): 288-297.

[25] 韩　睿, 李　琳, 王润清, 等. 间充质干细胞来源外泌体对免疫功能调控的作用与应用前景[J]. 中国组织工程研究, 2019, **23**(17): 2762-2769.

[26] FORSTER M D, DEVLIN M J. Immune checkpoint inhibition in head and neck cancer [J]. *Front Oncol*, 2018, **8**: 310.

[27] YOUSEFPOUR P, CHILKOTI A. Co-opting biology to deliver drugs [J]. *Biotechnol Bioeng*, 2014, **111**(9): 1699-1716.

[28] ELSHERBINI A, BIEBERICH E. Ceramide and exosomes: a novel target in cancer biology and therapy [J]. *Adv Cancer Res*, **140**: 121-154.

[29] TOMINAGA N, YOSHIOKA Y, OCHIYA T. A novel platform for cancer therapy using extracellular vesicles [J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2015, **95**: 50-55.

[30] CHENG Q, SHI X, HAN M, *et al*. Reprogramming exosomes as nanoscale controllers of cellular immunity [J]. *J Am Chem Soc*, 2018, **140**(48): 16413-16417.

[31] 张　杨, 游阿彬, 齐　寒, 等. 负载化疗药物的外泌体对肝癌的靶向治疗研究[J]. 天津医科大学学报, 2021, **27**(3): 229-233.

[32] GAO X, RAN N, DONG X, *et al*. Anchor peptide captures, targets, and loads exosomes of diverse origins for diagnostics and therapy [J]. *Sci Transl Med*, 2018, **10**(444): eaat0195.

[33] WANG J, TANG W, YANG M, *et al*. Inflammatory tumor microenvironment responsive neutrophil exosomes-based drug delivery system for targeted glioma therapy [J]. *Biomaterials*, 2021, **273**: 120784.

[34] LENASSI M, CAGNEY G, LIAO M, *et al*. HIV Nef is secreted in exosomes and triggers apoptosis in bystander $CD4^+$ T cells [J]. *Traffic*, 2010, **11**(1): 110-122.

[35] YANG C, ROBBINS P. The roles of tumor-derived exosomes in cancer pathogenesis [J]. *Clin Dev Immunol*, 2011, **2011**: 842849.

[36] SANSONE P, SAVINI C, KURELAC I, *et al*. Packaging and transfer of mitochondrial DNA via exosomes regulate escape from dormancy in hormonal therapy-resistant breast cancer [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2017, **114**(43): E9066-E9075.

[37] TAI Y L, CHEN K C, HSIEH J T, *et al*. Exosomes in cancer development and clinical applications [J]. *Cancer Sci*, 2018, **109**(8): 2364-2374.

[38] PUTZ U, HOWITT J, DOAN A, *et al*. The tumor suppressor PTEN is exported in exosomes and has phosphatase activity in recipient cells [J]. *Sci Signal*, 2012, **5**(243): ra70.

[39] LIN B, WANG Y, ZHAO K, *et al*. Exosome-based rare earth nanoparticles for targeted *in situ* and metastatic tumor imaging with chemo-assisted immunotherapy [J]. *Biomater Sci*, 2022, **10**(3): 744-752.

[40] MASHOURI L, YOUSEFI H, AREF A R, *et al*. Exosomes: composition, biogenesis, and mechanisms in cancer metastasis and drug resistance [J]. *Mol Cancer*, 2019, **18**(1): 75.

[41] JIANG S, TIAN G, YANG Z, *et al*. Enhancement of acellular cartilage matrix scaffold by Wharton's jelly mesenchymal stem cell-derived exosomes to promote osteochondral regeneration [J]. *Bioact Mater*, 2021, **6**(9): 2711-2728.

[42] LV C X, DUAN H, WANG S, *et al*. Exosomes derived from human umbilical cord mesenchymal stem cells promote proliferation of allogeneic endometrial stromal cells [J]. *Reprod Sci*, 2020, **27**(6): 1372-1381.

[43] ZHANG L, FAN C, HAO W, *et al*. NSCs migration promoted and drug delivered exosomes-collagen scaffold via a bio-specific peptide for one-step spinal cord injury repair [J]. *Adv Healthc Mater*, 2021, **10**(8): e2001896.

[44] HU L, WANG J, ZHOU X, *et al*. Author Correction: exosomes derived from human adipose mensenchymal stem cells accelerates cutaneous wound healing via optimizing the characteristics of fibroblasts [J]. *Sci Rep*, 2020, **10**(1):

6693.

[45] 赵贵芳. 脐带间充质干细胞及其来源外泌体修复皮肤损伤的机制研究[D]. 吉林: 吉林大学博士学位论文, 2016.

[46] SHI A, LI J, QIU X, *et al*. TGF-β loaded exosome enhances ischemic wound healing *in vitro* and *in vivo* [J]. *Theranostics*, 2021, **11**(13): 6616-6631.

[47] 高佳佳, 李 薇, 鞠 强, 等. 血清饥饿对结肠癌HCT116细胞外泌体分泌的影响[J]. 世界华人消化杂志, 2016, **24**(4): 566-572.

[48] GUO S, DEBBI L, ZOHAR B, *et al*. Stimulating extracellular vesicles production from engineered tissues by mechanical forces [J]. *Nano Lett*, 2021, **21**(6): 2497-2504.

[49] GHOLIZADEH S, SHEHATA DRAZ M, ZARGHOONI M, *et al*. Microfluidic approaches for isolation, detection, and characterization of extracellular vesicles: current status and future directions [J]. *Biosens Bioelectron*, 2017, **91**: 588-605.

[50] JEPPESEN D K, HVAM M L, PRIMDAHL-BENGTSON B, *et al*. Comparative analysis of discrete exosome fractions obtained by differential centrifugation [J]. *J Extracell Vesicles*, 2014, **3**: 25011.

[51] 刘 娜, 杜盼盼, 杨 扬, 等. 基于微流控技术的外泌体分离方法的研究进展[J]. 生物技术通报, 2019, **35**(1): 207-213.

[52] SEO N, NAKAMURA J, KANEDA T, *et al*. Distinguishing functional exosomes and other extracellular vesicles as a nucleic acid cargo by the anion-exchange method [J]. *J Extracell Vesicles*, 2022, **11**(3): e12205.

[53] OHNO S, TAKANASHI M, SUDO K, *et al*. Systemically injected exosomes targeted to EGFR deliver antitumor microRNA to breast cancer cells [J]. *Mol Ther*, 2013, **21**(1): 185-191.

[54] SUN D, ZHUANG X, XIANG X, *et al*. A novel nanoparticle drug delivery system: the anti-inflammatory activity of curcumin is enhanced when encapsulated in exosomes [J]. *Mol Ther*, 2010, **18**(9): 1606-1614.

[55] ALVAREZ-ERVITI L, SEOW Y, YIN H, *et al*. Delivery of siRNA to the mouse brain by systemic injection of targeted exosomes [J]. *Nat Biotechnol*, 2011, **29**(4): 341-345.

[56] LI Z, ZHOU X, WEI M, *et al*. *In vitro* and *in vivo* RNA inhibition by CD9-HuR functionalized exosomes encapsulated with miRNA or CRISPR/dCas9 [J]. *Nano Lett*, 2019, **19**(1): 19-28.

[57] YIM N, CHOI C. Extracellular vesicles as novel carriers for therapeutic molecules [J]. *BMB Rep*, 2016, **49**(11): 585-586.

[58] LIN Y, WU J, GU W, *et al*. Exosome-liposome hybrid nanoparticles deliver CRISPR/Cas9 system in MSCs [J]. *Adv Sci* (Weinh), 2018, **5**(4): 1700611.

[59] 吴 忧, 辛 林. 新的药物传递系统: 外泌体作为药物载体递送[J]. 中国生物工程杂志, 2020, **40**(9): 28-35.

[60] MAROTO R, ZHAO Y, JAMALUDDIN M, *et al*. Effects of storage temperature on airway exosome integrity for diagnostic and functional analyses [J]. *J Extracell Vesicles*, 2017, **6**(1): 1359478.

[61] JEYARAM A, JAY S M. Preservation and storage stability of extracellular vesicles for therapeutic applications[J]. *AAPS J*, 2018, **20**(1): 1.

[62] CHAROENVIRIYAKUL C, TAKAHASHI Y, NISHIKAWA M, *et al*. Preservation of exosomes at room temperature using lyophilization [J]. *Int J Pharm*, 2018, **553**(1/2): 1-7.

[63] BOSCH S, DE BEAUREPAIRE L, ALLARD M, *et al*. Trehalose prevents aggregation of exosomes and cryodamage [J]. *Sci Rep*, 2016, **6**: 36162.

[64] 韩 杰, 葛 安, 马晓霞, 等. 外泌体提取及保存技术研究进展[J]. 中国细胞生物学学报, 2021, **43**(2): 451-459.