专论 Perspectives

外泌体在基因递送系统中的研究进展

高舒颖，梁 爽，刘永军，张 娜*
（山东大学药学院，国家药品监督管理局药物制剂技术研究与评价重点实验室，山东济南 250012）

摘要：基因治疗为恶性肿瘤、遗传病及罕见病提供了一种新的治疗手段，但是基因在体内递送过程中存在多重屏障，限制了基因治疗在临床上的应用。因此，亟需合适的载体用于封装、递送和保护基因。外泌体是一种由活细胞（如肿瘤细胞、血小板、抗原呈递细胞等）主动分泌的脂质双分子层膜性囊泡，具备天然活性、高生物相容性、低免疫原性和低毒性等优势，被认为是潜力巨大的基因递送载体之一。该研究基于外泌体的优势，对外泌体的分离技术、负载基因的方式以及改造策略作一综述，为外泌体作为载体在基因治疗领域的研究提供了参考。

关键词：外泌体；细胞囊泡；基因；递送系统
中图分类号：R96；R450 **文献标志码**：A **文章编号**：1001-8255(2023)03-0295-09
DOI：10.16522/j.cnki.cjph.2023.03.001

Research Progress of Exosomes in Gene Delivery Systems

GAO Shuying, LIANG Shuang, LIU Yongjun, ZHANG Na*
(*NMPA Key Lab. for Technology Research and Evaluation of Drug Products*, *School of Pharmaceutical Sciences*, *Shandong University*, *Jinan 250012*)

ABSTRACT: Gene therapy provides a new treatment method for malignant tumors, genetic diseases and rare diseases. However, there are many barriers in the process of *in vivo* gene delivery, which limit the clinical application of gene therapy. It is urgently needed to develop suitable carriers for encapsulating, delivering and protecting gene. As a lipid bilayer membrane vesicle actively secreted by living cells (including tumor cells, platelets, antigen presenting cells), exosomes have many advantages, such as natural activity, high biocompatibility, low immunogenicity, and low toxicity, which are considered to be one of the most potential gene delivery carriers. Based on the advantages of exosomes, this paper reviews the isolation of exosomes, gene loading methods and transformation strategies of exosomes, which provides a reference for exosomes as a carrier in the field of gene therapy.

Key Words: exosome; cellular vesicle; gene; delivery system



【专家介绍】张娜，药剂学博士，山东大学药学院教授，博士生导师。主要从事靶向纳米给药系统用于药物、基因和诊断因子递送的研究。先后承担国家自然科学基金、教育部新世纪优秀人才支持计划、“重大新药创制”科技重大专项等课题。在*Adv Funct Mater*、*ACS Nano*、*Nano-Micro Lett*、*Adv Sci*、*Acta Pharm Sin B*等国际知名杂志发表研究论文120余篇，授权专利19项。2014—2022年连续被国际爱思唯尔(Elsevier)科学文献出版社评为中国高被引学者，入选药学领域2020全球2%顶尖科学家榜。

基因治疗可以通过引入遗传物质纠正患病细胞中的错误基因，从根本上治疗单基因疾病和其他罕见疾病[1]。2003 年，中国批准世界上首个基因治疗产品 Gendicine（重组人 p53 腺病毒注射液）用于治疗头颈部鳞状细胞癌；截至目前，全球已有 20 多个基因治疗产品上市，产品类型涉及寡核苷酸类、溶瘤病毒、嵌合抗原受体 T 细胞免疫治疗（CAR-T）、干细胞疗法等[1]。自 2019 新型冠状病毒疫情暴发以来，已有多款 mRNA 疫苗上市（如 Comirnaty、复必泰等），基因治疗再次成为新药开发的焦点。

然而基因在体内递送存在多种障碍：(1) 胞外基质吸附、内皮网状系统吞噬和核酸酶降解等细胞外屏障；(2) 基因因负电性、亲水性和相对分子质量高等特性而难以被细胞摄取；(3) 进入细胞后，基因可能被内涵体和溶酶体吞噬[2]。因此，寻找合适的载体克服基因递送的体内屏障是实现基因安全、高效以及可控表达亟需解决的问题[1—2]。

研究适宜的基因递送载体是基因治疗的前提。目前应用的基因载体主要包括病毒载体和非病毒载体。病毒载体转染效率高，但可能引起免疫反应、基因诱变等不良反应，并且其转移基因的量有限，最多仅能递送 40 kb 的基因片段[2]。近年来，非病毒载体以相对安全、易调节的理化性质、可大量生产、成本低以及负载能力较大等优势，开始被大量应用于基因递送领域[3]。其中，外泌体作为一种新兴的非病毒载体被广泛应用于基因递送的研究。

1　外泌体

外泌体是由自体细胞内的多囊泡体与细胞膜融合后以外分泌的形式释放到细胞外环境的纳米囊泡，其直径为 30 ～ 150 nm[4]。不同细胞来源的外泌体具有不同的功能，例如血小板分泌的外泌体能调节凝血反应，而来源于免疫细胞如 B 细胞和树突状细胞的外泌体可介导主要组织相容性复合体（major histocompatibility complex，MHC）依赖性免疫反应[5]。一般来说，外泌体成分会根据其来源而有所不同，但都含有蛋白质、基因和脂质，具体组成成分如图 1 所示。

VALADI 等[6] 首次发现外泌体中存在大量 RNA，并可被传递到其他受体细胞发挥作用，展示了外泌体作为基因载体的能力。基于此，目前多种来源的外泌体已被用作基因递送载体，包括肿瘤细胞、间充质干细胞、人胚肾细胞、免疫细胞、内皮细胞以及血细胞等（如表 1 所示），利用不同来源外泌体的靶向性，可提高基因的靶向递送效率，实现更有效的基因治疗[7]。

与其他基因递送系统相比，外泌体存在以下优势：(1) 膜表面的特异性蛋白使外泌体具有归巢特性和易修饰特性，实现靶向递送[8]、穿越血脑屏障和到达血供不足的组织或区域[9—10] 等功能；(2) 外泌体可以从患者的细胞中提取，最大程度降低细胞毒性和免疫原性[11]；(3) 避免内皮网状系统吞噬，在体内可存留较长时间，以实现更好的治疗作用[12]；(4) 某些来源的功能性外泌体（具有促再生和抗炎性）可以增强基因治疗效果[13]；(5) 可以与脂质体等载体形成杂合纳米载体，封装、递送 DNA 和质粒等大分子基因，且毒性较低[1]。基于上述优势，目前已有大量研究通过物理、化学或生物方法对外泌体进行修饰和改造，还可与基因工程等方法相结合，制备工程化外泌体，携载特定的基因至靶细胞中发挥治疗作用。

2　外泌体分离技术

基于外泌体的基因递送系统具有多种优势，但要实现临床应用，首先须分离得到外泌体并实现大规模生产[14]。目前常用的分离技术有超高速离心、超滤、免疫亲和捕获、聚合物沉淀、尺寸排阻色谱和微流控分离方法等（如表 2 所示）。然而，每种技术都存在一定的局限性，外泌体产量不足仍然是限制外泌体临床应用的一大阻碍。目前已有 3 种提高外泌体产量的方式，一是组合分离技术或开发新兴分离技术，例如黏弹性微流控技术可以实现简单、

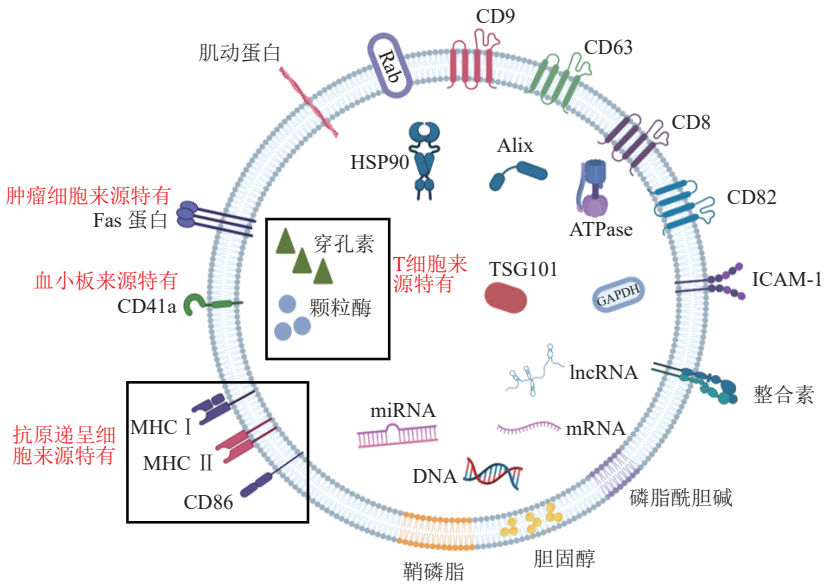
收稿日期：2022-04-26

基金项目：国家自然科学基金面上项目(82173757)、国家自然科学基金面上项目(82173756)

作者简介：高舒颖(1998—)，女，硕士研究生，专业方向：靶向纳米给药系统研究。

通信作者：张　娜(1969—)，女，教授，博士生导师，从事靶向纳米给药系统研究。

E-mail：zhangnancy9@sdu.edu.cn



Alix—凋亡相关基因 -2(ALG-2) 相互作用蛋白 X；ICAM-1—细胞间黏附分子 -1；TSG101—肿瘤易感基因 101；lncRNA—长链非编码 RNA；mRNA—信使 RNA；miRNA—微 RNA；HSP90—热休克蛋白 90。

图 1 不同来源外泌体的组成

Fig.1 Composition of Exosomes from Different Sources

表 1 不同类型外泌体的优缺点 [7]

Tab.1 Advantages and Disadvantages of Different Types of Exosomes[7]

类型	来源	优点	缺点
细胞分泌的外泌体	人胚肾细胞	易增长；转染效率高；允许通过基因工程进行膜修饰	免疫惰性
	肿瘤细胞	可以靶向同型肿瘤	药代动力学特征不太理想；可参与肿瘤的发展和转移过程；有潜在的安全性问题
	免疫细胞	诱导有效的细胞免疫反应；含有抑制肿瘤生长的蛋白和细胞毒分子；可穿透血脑屏障	缺乏对外泌体成分与受体细胞相互作用机制的研究
	干细胞(如间充质干细胞等)	免疫调节特性；生长成本低；良好的归巢和穿透能力	外泌体的成分组成和生物学行为机制不明确
血细胞来源的外泌体	血细胞	来源广泛；转染效率高；具有脑靶向能力	未明确

高通量的外泌体分离，回收率高达 81% [15]；二是更改外泌体的来源，相比于细胞来源的外泌体，食物来源的外泌体因成本低，可实现更高产量 [16]；三是给予适当的刺激以促进外泌体的分泌，例如使用单宁刺激以增加细胞内钙水平、给予外部压力(如缺氧)、使用巯基封闭剂阻碍细胞骨架功能、添加脂质体刺激等均可增加外泌体的产量 [17]。

3 外泌体装载基因的策略

由于外泌体具有磷脂双分子层结构，将亲水性基因导入外泌体中具有挑战性。目前已报道了多种方法可使外泌体负载基因，主要包括被动方法和主动方法(如表 3 所示 [18—21])。

3.1 被动方法

被动方法是通过孵育将药物导入外泌体，优点是不会破坏外泌体的完整性。目前，已有研究团队使用胆固醇对基因进行疏水修饰，使其更易进入外泌体中，并且有利于维持外泌体的结构完整性 [18]。此外，可以使用阳离子脂质体负载基因，然后通过孵育将该脂质体封装到外泌体中。近年，有一项研究 [22] 利用此法将编码新型冠状病毒 spike 和核衣壳

抗原的 mRNA 成功包载入外泌体中，实现了至少 84 d 的抗病毒免疫反应。

3.2 主动方法

主动方法是先通过物理或化学手段暂时改变磷脂双分子层的疏水性，然后将基因导入外泌体的一种策略，主要包括电穿孔、超声和反复冻融等技术。

3.2.1 电穿孔法

电穿孔法采用瞬时、高电压脉冲使外泌体的脂质双层膜结构发生改变，产生的大量微小空隙能允许基因进入外泌体中，这些孔隙在电脉冲消失后能自动重新封闭。该法具有简单、快速、成本低以及电参数容易调整和控制等优点[23]。ALVAREZ-ERVITI 等[11]在 2011 年报道使用电穿孔技术将干扰小 RNA（siRNA）导入外泌体中，这是首个将外泌体作为基因递送载体的研究。基于此研究，KAMERKAR 等[19]对成纤维细胞来源的外泌体进行修饰，通过电穿孔将 siRNA 引入外泌体中，成功沉默了突变 *Kras* 基因的表达，显示出治疗胰腺癌的潜力。该团队在此研究基础上还建立了符合 GMP 规范的工程化外泌体制备技术[24]，并已进入临床Ⅰ期阶段（NCT03608631）。

虽然已有多项研究使用电穿孔技术成功使外泌体负载基因并达到预期治疗效果的报道，但是电穿孔技术仍然存在一些不足，例如，其引发的基因聚集以及外泌体 ζ 电位和胶体的不稳定性[25—27]。优化电穿孔方法的操作参数，有可能改善上述缺点。例如，有研究[28]报道可通过改变电穿孔参数（电压、电极材料和电穿孔缓冲液等）减少基因聚集。另外，以电穿孔技术负载基因后，通过改进外泌体的纯化手段也可提高其转染效率[29]。

3.2.2 超声法

超声通常被用作破坏脂质或细胞膜。有研究[30]证明，与不使用超声相比，使用低功率（50 或 60 Hz）超声时，细胞分泌出来的外泌体的大小、膜完整性和摄取性能会有所改变，因此可以通过改变超声频率，在保证外泌体结构完整性的基础上，使基因通过暂时生成的微孔进入外泌体中。例如，HANEY 等[31]使用优化后的超声参数（500 V，2 kHz，20% 功率，6 个周期，每周期 4 s 脉冲、2 s 停顿），可以使外泌体膜形成暂时的微孔，这些微孔在特定温

表 2　常用的外泌体分离技术

Tab.2　Common Technologies for Exosomes Isolation

分离方法	原理	优势	局限性
超速离心法	大小和密度	成本低；技术成熟、简单；适合大容量制备	设备要求高；费时；回收率和纯度较低
超滤法	大小和相对分子质量	设备成本低	剪切应力可能会破坏外泌体结构
尺寸排阻色谱法	大小和相对分子质量	产品纯度高；可以快速制备；能保持外泌体的天然状态；重现性良好；能处理所有类型的样品	设备成本相对较高；需要额外的外泌体富集方法
聚合物沉淀法	表面电荷、溶解性和分散性	易于使用；设备要求较低；适用于所有容量样品的制备；效率高	需要复杂的净化步骤；影响分析和定量结果
免疫亲和捕获法	特异性抗原-抗体反应	适用于分离特定来源的外泌体；产品纯度高；无化学污染	使用抗体造成成本升高；必须优化外泌体标记方法；产量低；额外的洗脱步骤可能会破坏外泌体结构
基于微流体的技术	基于不同原理，包括免疫亲和性、大小、密度等	高效；经济	样品容量低

表 3　外泌体常用装载基因策略

Tab.3　Common Strategies of Gene Loading to Exosomes

方法分类	具体方法	影响装载效率因素	优点	缺点	外泌体来源	参考文献
被动	孵育	基因的分子大小和电荷	操作简单	装载效率低	胶质母细胞瘤U87细胞系	[18]
主动	电穿孔	电压、电脉冲长度、电穿孔缓冲液、电极材料	装载效率高	基因聚集	成纤维细胞	[19]
	超声	超声设备、超声强度、超声持续时间和周期	装载效率高	外泌体的重组或变形；超声强度控制不当会破坏外泌体的完整性	人胚肾细胞和人乳腺癌细胞	[20]
	反复冻融	冻融循环和温度、pH值	装载效率高	外泌体聚集	血浆	[21]

度下孵育 1 ～ 2 h 便可消失。此外，LAMICHHANE 等 [20] 报道超声可提高基因的负载率，结果显示，与电穿孔法相比，基因和外泌体的混合物溶液经超声处理后，外泌体的基因封装率可从 0.16% 提高至 2.96%。

3.2.3 反复冻融法

反复冻融是一种物理过程，无需提供电场和超声，只需将外泌体和基因的混合液快速冷冻和解冻。经历 3 个冻融循环后，在冷冻过程中形成的冰晶可暂时破坏磷脂双分子层，从而达到将基因导入外泌体中的目的 [21,32]。WON 等 [21] 通过反复冻融法，成功将 miR-140 封装入外泌体中，该基因递送系统通过正调控软骨分化相关基因的表达，从而促进软骨分化。虽然反复冻融法相比于其他方法能更加完整地维持保持外泌体膜的结构，但基因药物在反复冻融过程中的活性可能会改变 [32]。

3.3 其他新技术

外泌体包载基因的策略除了上述常用的方法以外，近几年也开发了多种能提高基因封装率的新技术。JEYARAM 等 [33] 将外泌体质子化以产生跨外泌体膜的 pH 梯度，再基于该原理来增强对基因药物的封装。该法尤其适于封装 miRNA、siRNA 和单链 DNA，并且加载过程不会引起基因降解，未被包封的基因还可以重复利用。YANG 等 [34] 开发了一种细胞纳米穿孔化（cellular nanoporation，CNP）生物芯片，将该芯片放置于含目标基因的缓冲液中，芯片表面的一系列纳米通道可以产生瞬时电脉冲，使缓冲液中的质粒顺着电势差导入芯片表面培养的单层细胞中。此后，细胞开始修复膜并将目标质粒转录为 mRNA，同时大量分泌外泌体。相比于传统的电穿孔法，CNP 芯片技术可以实现外泌体的大量生产，并且 mRNA 负载率可达到（55.5±9.2）%。

4 治疗性外泌体的设计策略及应用

目前已有多项研究将基因药物封装入自体细胞分泌的外泌体中，利用供体细胞来源外泌体的靶向性，归巢到病灶部位并释放基因药物，取得了理想的治疗效果。例如，树突状细胞衍生的外泌体表面表达的细胞间黏附分子 -1（ICAM-1）可与活化 T 细胞上表达的淋巴细胞相关抗原 -1（LFA-1）相互作用，从而实现基因药物对 T 细胞的靶向功能 [35]。大多数未经修饰的外泌体的靶向功能具有一定局限性，例如尚未发现未修饰的外泌体具有良好的缺氧受损心肌细胞的靶向性 [36]。另外，未经修饰的外泌体进入体内易被溶酶体吞噬，体内循环时间较短，静脉给药的外泌体循环时间仅为 2 ～ 30 min[36]，限制了外泌体作为基因递送载体在临床的应用和研究。因此，通过基因工程、化学修饰以及杂交等策略对外泌体进行修饰，可能提高负载基因外泌体的靶向能力，实现体内长循环（如图 2 所示）。

4.1 基因工程

外泌体膜由跨膜蛋白如溶酶体相关膜蛋白（Lamp）和四跨膜蛋白等组成，其可与靶向配体融合以增强外泌体的位点特异性递送 [37]。将编码 Lamp-2b 和神经系统特异性狂犬病病毒糖蛋白肽的质粒转染树突细胞，再用其分泌得到工程化外泌体，可以实现脑靶向功能 [11]。LIANG 等 [10] 将软骨细胞亲和肽与 Lamp-2b 融合，得到的工程化外泌体可以有效负载 miR-140，可在体内外靶向软骨细胞，且可在其中至少持续释放 72 h，为基于外泌体的骨关节炎治疗开辟了一条有效且可行的新途径。LI 等 [38] 将编码 CD9- 人类抗原 R（HuR）的质粒转染细胞，利用 HuR 和 RNA 的高亲和力可以提高外泌体的载药效率（可提升 10 倍左右），还可以负载 CRISPR/Cas9 基因编辑技术所需的较大尺寸核酸。然而，在外泌体膜中引入靶向部分可能会影响外泌体膜蛋白的正常功能，并且与未经过基因工程修饰的外泌体技术相比，还需要采用改良的纯化技术来分离工程化外泌体 [37]。

4.2 化学修饰

点击化学技术是通过 1- 乙基 -3-（3- 二甲基氨基丙基）碳二亚胺 -*N*- 羟基琥珀酰亚胺（EDC-NHS）缩合反应将炔基连接到外泌体上，然后在铜的催化作用下将其与靶向基团结构中的叠氮基共价结合 [37]，该法可将小分子染料和含叠氮基团的模型蛋白修饰于外泌体表面。ZHU 等 [39] 使用改良的点击化学技术（无铜）将缺血心肌靶向肽结合至外

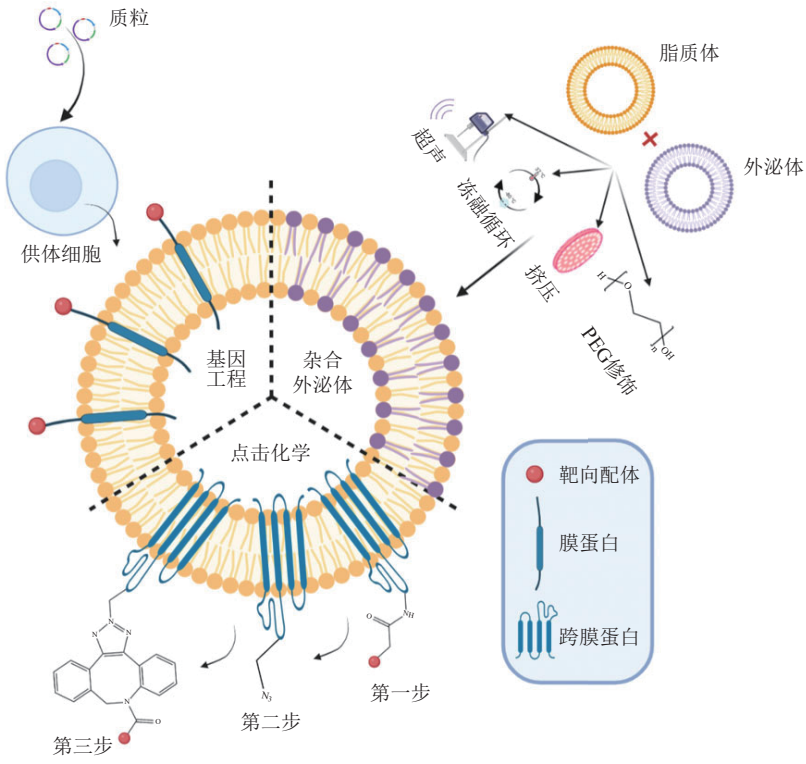


图 2　治疗性外泌体的设计策略

Fig.2　Design Strategies for Therapeutic Exosomes

泌体表面，提高了缺氧条件下骨髓间充质干细胞衍生的外泌体对受伤心脏缺血病变的靶向能力。在此基础上，ZHANG 等[40]开发了生物正交无铜叠氮炔环加成方法，将环（Arg-Gly-Asp-D-Tyr-Lys）肽［c(RGDyK)］结合到外泌体表面。该外泌体在静脉给药后可以靶向缺血脑内皮细胞，并持续至少 14 d 的表达。点击化学可以将外泌体与靶向配体共价结合起来，并将一些“不要吃我”相关信号分子（如 CD24、β2M、App1）结合至外泌体膜，从而增加体内循环时间[41]。

4.3　杂合外泌体

外泌体已被证明可负载 siRNA 和 mRNA 等较小尺寸的基因，但对于 DNA 和 CRISPR/Cas9 技术获得产物的完整包载和完全表达仍然存在困难[42]。有研究[43]指出可以通过构建杂合外泌体体系来实现较大尺寸基因的封装。杂交策略主要包括 2 种：一是通过反复冻融、挤压、超声或聚乙二醇（PEG）修饰等方法诱导外泌体与其他载体，融合生成杂合外泌体[44]，例如脂质体和外泌体通过反复冻融形成的杂合外泌体可以递送和表达 CRISPR/Cas9 产物[43]；二是在 PEG、电流或导入病毒载体等条件下融合 2 种供体细胞，其生成的混合细胞可以分泌具有双重特性的外泌体，例如将树突细胞和肿瘤细胞融合，二者融合后产生的外泌体可以表达肿瘤抗原相关 MHC Ⅰ和Ⅱ的复合物，以及 T 细胞活化所需的共刺激分子[45]。在此基础上，最新一项研究[46]将肿瘤细胞核引入活化的 M1 巨噬细胞产生嵌合外泌体，使外泌体具备对肿瘤部位和淋巴结的双重归巢能力，从而达到有效抑制原发性肿瘤、肿瘤转移和术后肿瘤复发的目的。嵌合外泌体有希望被改造为基因递送系统，以实现基因免疫的个体化治疗。

5　总结与展望

外泌体因具有高生物相容性、高循环稳定性、低免疫原性和低毒性等优势，近几年来作为基因递送系统显示出巨大潜力。除了对完整外泌体进行修饰用于基因递送，近几年也有研究利用外泌体的归

巢特性，提取外泌体膜来包裹负载基因的纳米粒，以构建仿生纳米基因递送系统[47]。然而，要创建基于外泌体的商业化给药系统，必须克服一些挑战和障碍。(1) 外泌体的来源。尽管有多种内源性细胞可以用于制备外泌体，但是何种内源性细胞可以实现外泌体的相对高产，以及何种细胞能将对患者的损害和不良反应等可能性危险水平降到最低仍然不明确。(2) 高通量制备和纯化方法。目前已有离心、超滤、免疫亲和捕获等外泌体的制备和纯化技术，然而各自均存在回收率低、设备要求高或外泌体不纯等问题。虽然已有研究报道了外泌体的小规模 GMP 生产[24]，但是在大规模生产中仍然存在不足。(3) 外泌体的贮存。有研究[48]表明冷冻会造成体积较大的外泌体大量聚集，并且贮存条件会影响外泌体的蛋白质含量。(4) 临床试验标准。在进入临床前需对外泌体的用量和频率、给药方式、生物分布和清除率有明确的认识和具体的规定。在 2021 年，已有基于外泌体的基因递送系统进入临床Ⅰ期的试验 (NCT03608631)，标志着外泌体作为基因递送系统的重大突破。相信随着问题的解决和局限性的突破，基于外泌体的基因递送系统将有效促进基因治疗的发展。

致谢：山东大学青年学者未来计划（YSPSDU 和 2017WLJH40）给予资助。

参考文献：

[1] DUAN L, XU L, XU X, *et al*. Exosome-mediated delivery of gene vectors for gene therapy [J]. *Nanoscale*, 2021, **13**(3): 1387-1397.

[2] DARBAND S G, MIRZA-AGHAZADEH-ATTARI M, KAVIANI M, *et al*. Exosomes: natural nanoparticles as bio shuttles for RNAi delivery [J]. *J Control Release*, 2018, **289**: 158-170.

[3] BONO N, PONTI F, MANTOVANI D, *et al*. Non-viral *in vitro* gene delivery: it is now time to set the bar [J]. *Pharmaceutics*, 2020, **12**(2): 183.

[4] YANG X X, SUN C, WANG L, *et al*. New insight into isolation, identification techniques and medical applications of exosomes [J]. *J Control Release*, 2019, **308**: 119-129.

[5] PROPERZI F, LOGOZZI M, FAIS S. Exosomes: the future of biomarkers in medicine [J]. *Biomark Med*, 2013, **7**(5): 769-778.

[6] VALADI H, EKSTROM K, BOSSIOS A, *et al*. Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells [J]. *Nat Cell Biol*, 2007, **9**(6): 654-659.

[7] ZHANG Y, LIU Q, ZHANG X, *et al*. Recent advances in exosome-mediated nucleic acid delivery for cancer therapy [J]. *J Nanobiotechnology*, 2022, **20**(1): 279.

[8] RANA S, YUE S, STADEL D, *et al*. Toward tailored exosomes: the exosomal tetraspanin web contributes to target cell selection [J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2012, **44**(9): 1574-1584.

[9] MORAD G, CARMAN C V, HAGEDORN E J, *et al*. Tumor-derived extracellular vesicles breach the intact blood-brain barrier via transcytosis [J]. *ACS Nano*, 2019, **13**(12): 13853-13865.

[10] LIANG Y, XU X, LI X, *et al*. Chondrocyte-targeted microRNA delivery by engineered exosomes toward a cell-free osteoarthritis therapy [J]. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2020, **12**(33): 36938-36947.

[11] 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.

[12] 吴 忱, 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.

[13] HA D H, KIM H K, LEE J, *et al*. Mesenchymal stem/stromal cell-derived exosomes for immunomodulatory therapeutics and skin regeneration [J]. *Cells*, 2020, **9**(5): 1157.

[14] KIMIZ-GEBOLOGLU I, ONCEL S S. Exosomes: large-scale production, isolation, drug loading efficiency, and biodistribution and uptake [J]. *J Control Release*, 2022, **347**: 533-543.

[15] ZHOU Y, MA Z, TAYEBI M, *et al*. Submicron particle focusing and exosome sorting by wavy microchannel structures within viscoelastic fluids [J]. *Ana Chem*, 2019, **91**(7): 4577-4584.

[16] SCHULZ-SIEGMUND M, AIGNER A. Nucleic acid delivery with extracellular vesicles [J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2021, **173**: 89-111.

[17] LIU C, SU C. Design strategies and application progress of therapeutic exosomes [J]. *Theranostics*, 2019, **9**(4): 1015-1028.

[18] DIDIOT M C, HALL L M, COLES A H, *et al*. Exosome-

mediated delivery of hydrophobically modified siRNA for huntingtin mRNA silencing [J]. *Mol Ther*, 2016, **24**(10): 1836-1847.

[19] KAMERKAR S, LEBLEU V S, SUGIMOTO H, *et al*. Exosomes facilitate therapeutic targeting of oncogenic *Kras* in pancreatic cancer [J]. *Nature*, 2017, **546**(7659): 498-503.

[20] LAMICHHANE T N, JEYARAM A, PATEL D B, *et al*. Oncogene knockdown via active loading of small RNAs into extracellular vesicles by sonication [J]. *Cell Mol Bioeng*, 2016, **9**(3): 315-324.

[21] WON L G, THANGAVELU M, JOUNG C M, *et al*. Exosome mediated transfer of miRNA-140 promotes enhanced chondrogenic differentiation of bone marrow stem cells for enhanced cartilage repair and regeneration [J]. *J Cell Biochem*, 2020, **121**(7): 3642-3652.

[22] TSAI S J, ATAI N A, CACCIOTTOLO M, *et al*. Exosome-mediated mRNA delivery *in vivo* is safe and can be used to induce SARS-CoV-2 immunity [J]. *J Biol Chem*, 2021, **297**(5): 101266.

[23] AHMED R, SAYEGH N, GRACIOTTI M, *et al*. Electroporation as a method of choice to generate genetically modified dendritic cell cancer vaccines [J]. *Curr Opin Biotechnol*, 2020, **65**: 142-155.

[24] MENDT M, KAMERKAR S, SUGIMOTO H, *et al*. Generation and testing of clinical-grade exosomes for pancreatic cancer [J]. *JCI Insight*, 2018, **3**(8): e99263.

[25] KOOIJMANS S A A, STREMERSCH S, BRAECKMANS K, *et al*. Electroporation-induced siRNA precipitation obscures the efficiency of siRNA loading into extracellular vesicles [J]. *J Control Release*, 2013, **172**(1): 229-238.

[26] SUBHAN M A, ATTIA S A, TORCHILIN V P. Advances in siRNA delivery strategies for the treatment of MDR cancer [J]. *Life Sci*, 2021, **274**: 119337.

[27] LU M, ZHAO X, XING H, *et al*. Cell-free synthesis of connexin 43-integrated exosome-mimetic nanoparticles for siRNA delivery [J]. *Acta Biomater*, 2019, **96**: 517-536.

[28] JOHNSEN K B, GUDBERGSSON J M, SKOV M N, *et al*. Evaluation of electroporation-induced adverse effects on adipose-derived stem cell exosomes [J]. *Cytotechnology*, 2016, **68**(5): 2125-2138.

[29] XU L, FARUQU F N, LIM Y M, *et al*. Exosome-mediated RNAi of PAK4 prolongs survival of pancreatic cancer mouse model after loco-regional treatment [J]. *Biomaterials*, 2021, **264**: 120369.

[30] NIZAMUDEEN Z A, XERRI R, PARMENTER C, *et al*. Low-power sonication can alter extracellular vesicle size and properties [J]. *Cells*, 2021, **10**(9): 2413.

[31] HANEY M J, ZHAO Y, JIN Y S, *et al*. Macrophage-derived extracellular vesicles as drug delivery systems for triple negative breast cancer (TNBC) therapy [J]. *J Neuroimmune Pharmacol*, 2020, **15**(3): 487-500.

[32] WANG J, CHEN D, HO E A. Challenges in the development and establishment of exosome-based drug delivery systems [J]. *J Control Release*, 2021, **329**: 894-906.

[33] JEYARAM A, LAMICHHANE T N, WANG S, *et al*. Enhanced loading of functional miRNA cargo via pH gradient modification of extracellular vesicles [J]. *Mol Ther*, 2020, **28**(3): 975-985.

[34] YANG Z, SHI J, XIE J, *et al*. Large-scale generation of functional mRNA-encapsulating exosomes via cellular nanoporation [J]. *Nat Biomed Eng*, 2020, **4**(1): 69-83.

[35] NOLTE-T H E N, BUSCHOW S I, ANDERTON S M, *et al*. Activated T cells recruit exosomes secreted by dendritic cells via LFA-1 [J]. *Blood*, 2009, **113**(9): 1977-1981.

[36] DE ABREU R C, FERNANDES H, DA COSTA M P A, *et al*. Native and bioengineered extracellular vesicles for cardiovascular therapeutics [J]. *Nat Rev Cardiol*, 2020, **17**(11): 685-697.

[37] SALUNKHE S, DHEERA J, 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.

[38] 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.

[39] ZHU L P, TIAN T, WANG J Y, *et al*. Hypoxia-elicited mesenchymal stem cell-derived exosomes facilitates cardiac repair through miR-125b-mediated prevention of cell death in myocardial infarction [J]. *Theranostics*, 2018, **8**(22): 6163-6177.

[40] ZHANG H, WU J, WU J, *et al*. Exosome-mediated targeted delivery of miR-210 for angiogenic therapy after cerebral ischemia in mice [J]. *J Nanobiotechnology*, 2019, **17**(1): 29.

[41] PARADA N, ROMERO-TRUJILLO A, GEORGES N, *et al*. Camouflage strategies for therapeutic exosomes evasion from phagocytosis [J]. *J Adv Res*, 2021, **31**: 61-74.

[42] KIM S M, YANG Y, OH S J, *et al*. Cancer-derived exosomes as a delivery platform of CRISPR/Cas9 confer cancer cell tropism-dependent targeting [J]. *J Control Release*, 2017, **266**: 8-16.

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

[44] WANG S, HU X, WEI W, *et al*. Transformable vesicles for cancer immunotherapy [J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2021, **179**: 113905.

[45] LIU W L, ZOU M Z, LIU T, *et al*. Cytomembrane nanovaccines show therapeutic effects by mimicking tumor cells and antigen presenting cells [J]. *Nat Commun*, 2019, **10**(1): 3199.

[46] WANG S, LI F, YE T, *et al*. Macrophage-tumor chimeric exosomes accumulate in lymph node and tumor to activate the immune response and the tumor microenvironment [J]. *Sci Transl Med*, 2021, **13**(615): eabb6981.

[47] PEI W, LI X, BI R, *et al*. Exosome membrane-modified M2 macrophages targeted nanomedicine: treatment for allergic asthma [J]. *J Control Release*, 2021, **338**: 253-267.

[48] 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.

