

工程化细胞外囊泡修复骨缺损的再生作用

周洋^{1,2}, 刘可鑫³, 王得利¹, 孙璋²<https://doi.org/10.12307/2025.749>

投稿日期: 2024-08-05

采用日期: 2024-10-31

修回日期: 2024-11-30

在线日期: 2024-12-17

中图分类号:

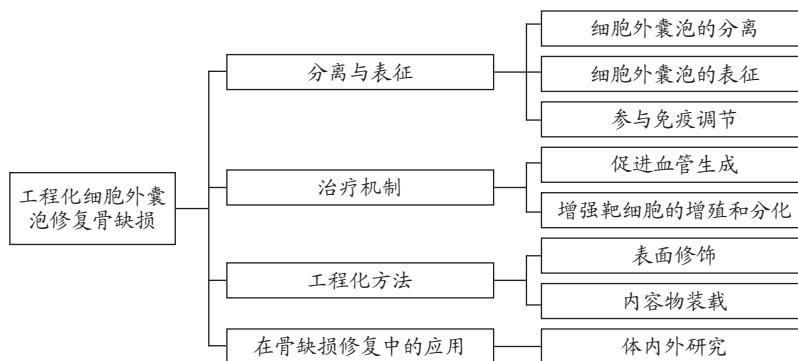
R459.9; R318; R683

文章编号:

2095-4344(2025)36-07839-09

文献标识码: A

文章快速阅读: 工程化细胞外囊泡在骨缺损再生修复中的作用和研究热点



文题释义:

工程化细胞外囊泡: 通过对天然来源的细胞外囊泡进行特定的改造或操控, 如在细胞外囊泡表面添加功能配体使其可以靶向受体细胞, 或向细胞外囊泡内部装载指定的内容物使其成为药物载体, 从而增强细胞外囊泡在再生医学中的治疗功能。

骨缺损: 指由骨质疏松性骨折、创伤、炎症反应、恶性肿瘤和各种其他因素, 导致骨组织局部缺失或不完整的情况。骨缺损可能影响骨骼的强度和功能, 并且根据缺损的大小和部位, 可能需要通过骨移植或再生修复手段来促进骨再生和恢复正常功能。

摘要

背景: 近年来细胞外囊泡在骨缺损再生修复领域受到广泛关注。然而, 天然细胞外囊泡在持续控释、组织靶向性和载药能力等方面存在不足。因此, 引入工程化策略对细胞外囊泡进行改造, 提高其治疗效果, 成为当前研究的热点。

目的: 对工程化细胞外囊泡在骨缺损再生修复中的作用和应用进展做一综述。

方法: 检索PubMed、Web of Science、中国知网和万方数据库中近15年的相关文献, 英文检索词为“engineering, extracellular vesicles, exosomes, bone defect, bone regeneration, bone repair”, 中文检索词为“工程化, 细胞外囊泡, 外泌体, 骨缺损, 骨再生, 骨修复”。经过筛选, 排除相关性差、陈旧和重复的文献, 对最终符合标准的93篇文献进行综述。

结果与结论: ①细胞外囊泡主要是基于密度、大小、免疫亲和力或表面电荷进行分离的, 分离后依赖成像技术、基于尺寸测定和计数的技术以及流式细胞术进行表征; ②细胞外囊泡通过调节免疫、血管生成、靶细胞的增殖与分化来刺激骨再生; ③细胞外囊泡的工程化策略包括表面修饰和内容物装载2个方面; ④利用工程化策略向细胞外囊泡引入骨形态发生蛋白2、突变缺氧诱导因子1 α 、血管内皮生长因子、miRNA和其他生物活性因子可以增强骨缺损再生修复能力。

关键词: 工程化; 细胞外囊泡; 外泌体; 骨缺损; 骨再生; 骨修复

Regenerative effects of engineered extracellular vesicles on repairing bone defects

Zhou Yang^{1,2}, Liu Kexin³, Wang Deli¹, Sun Zhang²

¹School of Stomatology, Mudanjiang Medical University, Mudanjiang 157011, Heilongjiang Province, China; ²Department of Stomatology, ³Department of Orthopedics, Affiliated Hongqi Hospital of Mudanjiang Medical University, Mudanjiang 157011, Heilongjiang Province, China

Zhou Yang, MS, School of Stomatology, Mudanjiang Medical University, Mudanjiang 157011, Heilongjiang Province, China; Department of Stomatology, Affiliated Hongqi Hospital of Mudanjiang Medical University, Mudanjiang 157011, Heilongjiang Province, China

Corresponding author: Sun Zhang, MM, Attending physician, Department of Stomatology, Affiliated Hongqi Hospital of Mudanjiang Medical University, Mudanjiang 157011, Heilongjiang Province, China

Abstract

BACKGROUND: Extracellular vesicles have received extensive attention in the field of bone defect regeneration and repair in recent years. However, natural extracellular vesicles have deficiencies in sustained controlled release, tissue targeting, and drug loading capacity. Therefore, the introduction of engineering strategies to modify extracellular vesicles to enhance their therapeutic efficacy has become a research hotspot.

OBJECTIVE: To review the role and application progress of engineered extracellular vesicles in the regeneration and repair of bone defects.

METHODS: PubMed, Web of Science, CNKI, and WanFang databases were searched for relevant articles published in the past fifteen years. The search terms were “engineering, extracellular vesicles, exosomes, bone defect, bone regeneration, bone repair” in Chinese and English. After removal of poorly related, outdated, and duplicate studies by screening, 93 articles were finally included for review according to inclusion criteria.

¹牡丹江医科大学口腔医学院, 黑龙江省牡丹江市 157011; 牡丹江医科大学附属红旗医院, ²口腔科, ³骨科, 黑龙江省牡丹江市 157011

第一作者: 周洋, 1986年生, 黑龙江省牡丹江市人, 汉族, 硕士, 主要从事口腔及骨生物医学材料和再生修复相关研究。

通讯作者: 孙璋, 硕士, 主治医师, 牡丹江医科大学附属红旗医院口腔科, 黑龙江省牡丹江市 157011

<https://orcid.org/0009-0002-4811-7745>(周洋)

基金资助: 黑龙江省卫生健康委科研课题(20230808030122), 项目负责人: 周洋; 2020年度黑龙江省省属高等学校基本科研业务费科研项目(2020-KYYWFMY-0766), 项目负责人: 周洋

引用本文: 周洋, 刘可鑫, 王得利, 孙璋. 工程化细胞外囊泡修复骨缺损的再生作用 [J]. 中国组织工程研究, 2025, 29(36):

7839-7847.



RESULTS AND CONCLUSION: (1) Extracellular vesicles are primarily isolated based on their density, size, immunoaffinity, and surface charge. After isolation, extracellular vesicles are characterized using imaging techniques, size- and counting-based techniques, and flow cytometry. (2) Extracellular vesicles stimulate bone regeneration by regulating immunity, angiogenesis, and proliferation and differentiation of target cells. (3) The engineering strategies of extracellular vesicles include surface modification and cargo loading. (4) The introduction of bone morphogenetic protein 2, mutant hypoxia-inducible factor-1 α , vascular endothelial growth factor, miRNA and other bioactive factors into extracellular vesicles through engineering strategies can enhance their regenerative repair ability for bone defects.

Key words: engineering; extracellular vesicles; exosomes; bone defects; bone regeneraton; bone repair

Funding: Heilongjiang Provincial Health Commission Research Project, No. 20230808030122 (to ZY); 2020 Basic Research Business Expenses Research Project of Heilongjiang Provincial Higher Education Institutions, No. 2020-KYYWFMY-0766 (to ZY)

How to cite this article: ZHOU Y, LIU KX, WANG DL, SUN Z. Regenerative effects of engineered extracellular vesicles on repairing bone defects. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu.* 2025;29(36):7839-7847.

0 引言 Introduction

骨缺损是由骨质疏松性骨折、创伤、炎症反应、恶性肿瘤和各种其他因素引起的骨组织局部缺失或不完整。对于小的缺损，骨组织可以通过自我修复和再生完成愈合。然而，当缺损尺寸超过临界阈值（约 > 2 cm）或骨周长损失超过 50% 时，骨缺损将难以愈合或者畸形愈合^[1]。临床上，骨缺损的主要治疗方法是骨移植，可以采用自体骨、同种异体骨或合成材料。然而，传统的骨移植手术存在着诸多局限性。自体骨移植尽管被认为是骨移植的金标准，但面临骨量有限、供骨部位并发症高等问题^[2]。相比之下，同种异体骨移植的优点在于取材广泛、骨量充足，且可以自行选择同种异体骨的结构，但存在免疫排斥和感染的风险^[3]。合成材料类型众多，遗憾的是这些合成材料的骨诱导和成骨性能有限，且吸收率不稳定，无法成为理想的骨替代品^[3]。因此，如何有效修复骨缺损对于提高患者的生活质量至关重要。

细胞再生疗法的出现为骨缺损修复带来了新的希望。细胞治疗因具有抗炎、免疫调节、增强靶细胞的增殖与分化而展现出巨大潜力。然而，细胞疗法存在不可避免的局限性，如输注毒性、免疫原性、致瘤性和伦理问题^[4]。相比之下，细胞外囊泡 (extracellular vesicles, EVs) 被认为是细胞疗法更安全、用途更广泛的替代品，其在骨再生修复领域引起了广泛关注。

细胞外囊泡是所有细胞类型分泌的异质性双层脂质膜囊泡的统称。细胞外囊泡亚型众多，根据生物发生途径和尺寸大小的不同，主要分为外泌体、微囊泡和凋亡小体 3 种亚型^[5]。外泌体在多囊泡体内形成，并在多囊泡体与质膜融合时释放，直径通常为 50–150 nm^[6]；微囊泡是质膜直接向外出芽形成，直径在 100–1 000 nm 之间^[7]；凋亡小体是在细胞凋亡过程中形成的囊泡，直径为 100–5 000 nm^[8]。细胞外囊泡携带多种内容物可以从亲本细胞转移到受体细胞，介导细胞间通讯和分子转移^[9]。天然细胞外囊泡可以诱导成骨、血管生成和调节免疫，并具有良好的生物相容性、长期稳定性和低免疫原性，这使得其在骨再生领域得到了广泛的应用^[10]。然而，随着研究的深入，天然细胞外囊泡被发现很难在病变部位实现持续聚集和控释，同时还存在组织靶向能力不足、载药能力有限和产量不足等问题^[11]，因此工程化细胞外囊泡应运而生。表面修饰和内容物装载的工程化策略不仅可以提高细胞外囊泡的靶向性和可拓展性，还能增强组织再生疗效^[12]。此综述首先介绍了细胞外囊泡的分离方法与表征，随后

对细胞外囊泡的治疗机制和工程化策略进行归纳总结，最后重点阐述了工程化细胞外囊泡在骨缺损再生修复中的应用进展，以期工程化细胞外囊泡的临床转化提供新思路。

1 资料和方法 Data and methods

1.1 资料来源

1.1.1 检索人及检索时间 第一作者在 2024 年 7 月进行检索，并实时更新。

1.1.2 检索文献时限 近 15 年的中英文文献。

1.1.3 检索数据库 英文数据库：PubMed 数据库 (<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/>) 和 Web of Science 数据库 (<https://webofscience.clarivate.cn/wos/allldb/basic-search>) (检索核心集)，搜索高质量文章，并且可追踪文章的起源和发展。中文数据库：中国知网和万方数据库。

1.1.4 检索途径 主题词、关键词、标题/摘要及部分全文检索。

1.1.5 检索词 中文检索词为“工程化，细胞外囊泡，外泌体，骨缺损，骨再生，骨修复”。英文检索词为“engineering, extracellular vesicles, exosomes, bone defect, bone regeneration, bone repair”。

1.1.6 检索文献类型 研究原著和综述。

1.1.7 检索策略 以 PubMed 数据库为例，见图 1。

```
#1 extracellular vesicles [Title/Abstract]
#2 EVs [Title/Abstract]
#3 exosomes [Title/Abstract]
#4 #1 OR #2 OR #3
#5 bone [Title/Abstract]
#6 bone defects [Title/Abstract]
#7 bone regeneration [Title/Abstract]
#8 bone repair [Title/Abstract]
#9 #5 OR #6 OR #7 OR #8
#10 engineering [Title/Abstract]
#11 surface modification [Title/Abstract]
#12 cargo loading [Title/Abstract]
#13 #10 OR #11 OR #12
```

图 1 | PubMed 数据库检索策略

1.1.8 检索文献量 检索文献总数 629 篇，中文文献 127 篇，英文文献 502 篇。

1.2 入选标准 ①细胞外囊泡和骨缺损、骨再生修复相关的研究和综述；②质量高，其中英文文献 90% 以上来源于 Web of Science 核心集，中文文献来源于北大核心期刊；

③具有创新性；④非重复性的文献。

1.3 质量评估 排除内容相关性差、重复性高、陈旧性以及文章质量较低的文献。

1.4 数据提取 共检索到 629 篇文献，排除陈旧、重复以及相关程度低的文献，共纳入 93 篇符合标准的文献进行综述，文献筛选流程，见图 2。

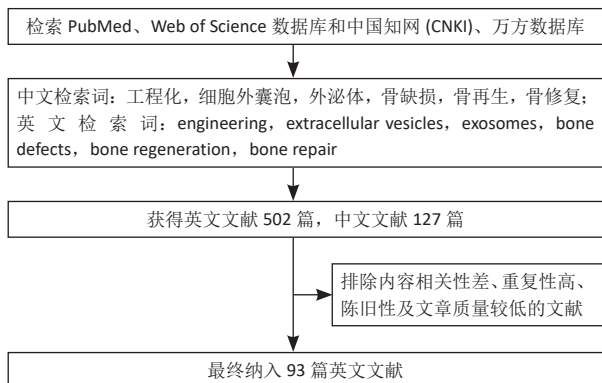


图 2 | 文献筛选流程图

2 结果 Results

2.1 细胞外囊泡的分离与表征 几乎所有细胞类型都可以产生细胞外囊泡，其分布广泛，存在于各种体液中。自 1946 年细胞外囊泡首次被发现^[13]，到如今国际细胞外囊泡学会成立并发布指南文件以支持和规范全球细胞外囊泡研究，数十年来对于细胞外囊泡的研究不断取得新突破^[14-20]，见图 3。然而，它们的物理性质和功能的异质性尚未完全了解，这阻碍了细胞外囊泡进一步的临床应用。由于细胞外囊泡异质性带来的挑战，目前研究者们正努力改进分离和表征特定细胞外囊泡群体的方法。

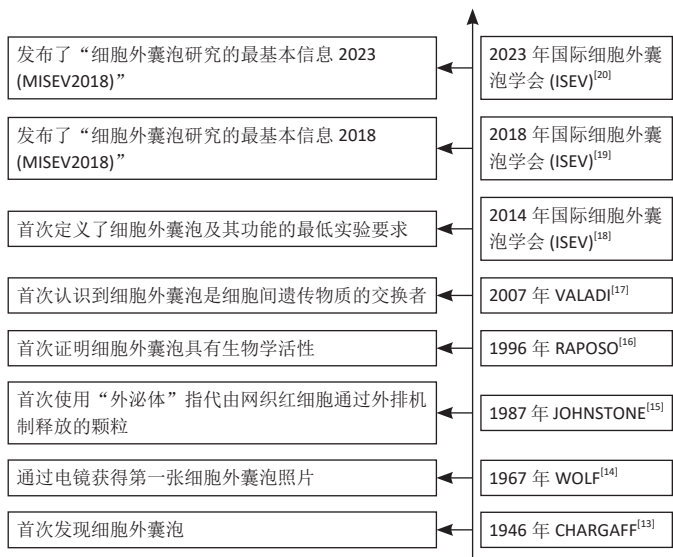


图 3 | 细胞外囊泡研究发展时间脉络图

2.1.1 细胞外囊泡的分离 目前，细胞外囊泡主要是基于密度、大小、免疫亲和力或表面电荷进行分离的。基于超速离心是分离细胞外囊泡最广泛使用的方法，主要包

括差速超速离心和密度梯度离心^[21]。尽管超速离心方案操作简单，但存在耗时、成本高的问题，不适合高通量应用^[22]。细胞外囊泡也可以根据尺寸进行分离，其中最流行的方法之一是超滤。超滤显著降低了细胞外囊泡破裂的可能性，但获得的细胞外囊泡制剂通常会被直径相似的分子污染^[23]。为了解决这个问题，超滤经常与超速离心一起使用。尺寸排阻色谱法也是基于尺寸进行分离，但其应用范围较窄，不适合大体积样品^[24-25]。免疫亲和捕获技术是利用细胞外囊泡某些表面蛋白和受体来开发的，其分离的细胞外囊泡产量相对较低但纯度较高^[26-27]。基于标记的微流控技术可根据化学或物理性质特异性地与细胞外囊泡表面相应的脂质成分或蛋白质结合，但是成本相对较高，标记操作复杂，捕获分子也可能改变细胞外囊泡的物理和生物学特性^[28]。为了减少标记对后续实验的影响，研究者们提出了无标记分离策略，可以保证细胞外囊泡的结构和生物完整性^[28]。单一的细胞外囊泡分离方法总存在或多或少的不足，利用互补的组合分离策略以获得更高纯度和产量的细胞外囊泡制剂，可能是未来潜在的解决方案。

2.1.2 细胞外囊泡的表征 为了保证细胞外囊泡制剂实现可重复安全和有针对性的治疗，在应用前需要对其进行表征。目前可用的方法允许确定细胞外囊泡的大小、浓度、形态和特定内容物，见图 4。

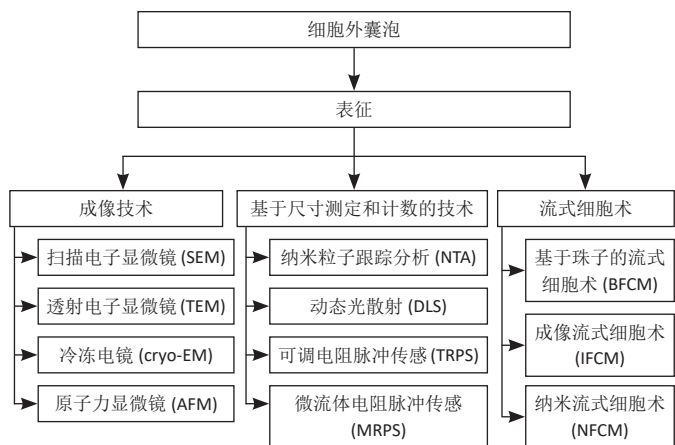


图 4 | 细胞外囊泡的表征示意图

成像技术常用的方法包括扫描电子显微镜、透射电子显微镜、冷冻电镜和原子力显微镜。扫描电子显微镜是通过捕获发射的电子来创建细胞外囊泡表面形貌的图像，无法区分囊泡和非囊泡粒子^[29]；相比之下，透射电子显微镜可提供囊泡内部的附加信息，不过测量结果可能会受到样品制备程序的强烈影响^[30]；冷冻电镜通过冷冻固定技术可以很好地保留水合囊泡的实际形态，从而避免传统固定造成的伪影^[31]；原子力显微镜同样能够捕获天然细胞外囊泡结构，但需要在不同的实验条件下进行分析，这对实验设备和用户操作提出了很高的要求^[32]。不同于成像技术，基于尺寸测定和计数的技术可以获得关于细胞外囊泡尺寸分布和浓度的更精确信息，常见的方法有纳米粒子跟踪分析、动态光散射、可

调电阻脉冲传感和微流体电阻脉冲传感^[21]。纳米粒子跟踪分析作为一种非侵入性技术,对细胞外囊泡尺寸检测的极限为40–50 nm^[33];动态光散射利用了流体动力学粒子的光散射原理,对细胞外囊泡直径检测可以小至10 nm^[34];可调电阻脉冲传感能可靠、快速地测量出细胞外囊泡大小和浓度分布,但是穿过它的粒子可能堵塞孔隙^[35];微流体电阻脉冲传感是对可调电阻脉冲传感的改进,可以检测样品中存在的不同大小的囊泡群^[36]。新开发的成像流式细胞术和纳米流式细胞术可以提供更高的分辨率,并且能够区分染色的细胞外囊泡和背景信号,该方法依赖高水平的专业知识和昂贵设备^[36-37]。此外,大多数机器仍需要用染料标记细胞外囊泡才能够有效检测,这可能会干扰下游分析^[37]。

2.2 细胞外囊泡调节骨再生的治疗机制 骨缺损的再生修复是一个复杂的过程,需要多方面的机制协同作用才能有效进行。细胞外囊泡可以通过免疫调节、血管生成以及靶细胞的增殖与分化这3个主要机制调节骨再生,其在骨缺损组织的再生修复中扮演着重要角色。接下来,将详细探讨这些机制如何协同作用,共同促进骨缺损组织的再生,见图5。

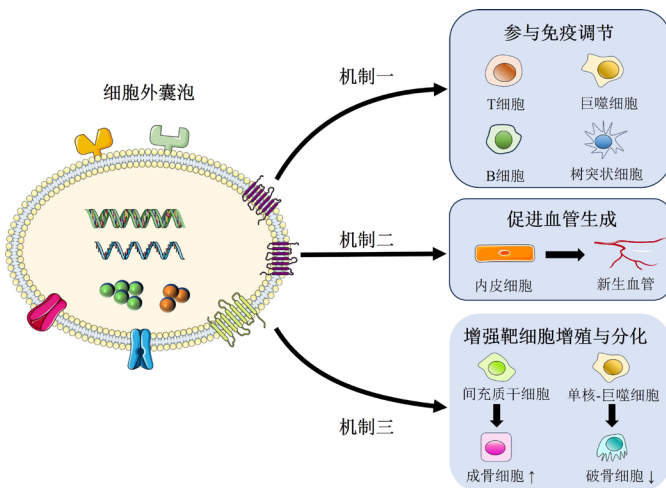


图5 | 细胞外囊泡调节骨再生的治疗机制

2.2.1 参与免疫调节 骨缺损在损伤早期需要适度的炎症反应,但是过度活跃和持续的炎症会阻碍骨再生并导致炎症损伤。细胞外囊泡是免疫调节的重要参与者,在骨再生修复过程中发挥关键作用。根据释放细胞外囊泡的细胞来源和状态,它们既能介导免疫刺激,也能抑制免疫反应。细胞外囊泡可以调节多种免疫细胞的功能,包括T细胞、B细胞、巨噬细胞和树突状细胞^[38]。T细胞介导的免疫调节是控制自身免疫或炎症性疾病的重要工具。有研究发现,人脐静脉内皮细胞来源的细胞外囊泡含有高浓度的程序性死亡配体1,可特异地与T细胞表面程序性死亡受体1结合,从而抑制T细胞的活化,在早期过度活跃炎症阶段显著促进了骨痂形成和骨折愈合^[39]。细胞外囊泡与亲本细胞具有相似的分子组成,可以继承亲本细胞的免疫调节能力。考虑到间充质干细胞良好的免疫调节能力,间充质干细胞衍生的细胞外囊泡也得到了深入研究。多

项研究表明间充质干细胞衍生的细胞外囊泡可以抑制T细胞和B细胞的增殖,同时降低外周血单核细胞在体内释放细胞因子的能力^[40]。M2型巨噬细胞具有抗炎表型,主要负责巨噬细胞极化过程中的组织重塑。间充质干细胞衍生的细胞外囊泡在单核细胞中诱导为M2样表型,诱导T细胞分化为调节性T细胞,并减弱体内的免疫活性^[41]。REIS等^[42]研究表明,间充质干细胞衍生的细胞外囊泡影响了树突状细胞对抗原的吸收,抑制了树突状细胞的成熟、促炎因子白细胞介素6和白细胞介素12p70的分泌,并增加了抗炎细胞因子转化生长因子 β 的产生。细胞外囊泡已成为一种有吸引力的免疫调节和免疫介导疾病的治疗方法。

2.2.2 促进血管生成 血管生成是指从现有血管网络中萌发和长出新血管的过程,它对于骨组织的再生修复至关重要。血管生成涉及多个过程,包括内皮细胞的增殖、募集和迁移,以及通过壁细胞来稳定新形成的血管。细胞外囊泡在促进血管生成中也发挥着关键作用,该作用与细胞外囊泡中所含相应配体和细胞因子的靶向作用密切相关,例如血管内皮生长因子、血小板衍生生长因子、基质金属蛋白酶和miRNA^[43-46]。LIU等^[47]将诱导性多能干细胞来源的间充质干细胞衍生细胞外囊泡静脉注射到大鼠骨坏死模型中,结果显示间充质干细胞衍生细胞外囊泡可以激活内皮细胞中的磷脂酰肌醇3激酶(phosphoinositide 3 kinase, PI3K)/蛋白激酶B(protein kinase B, AKT)信号通路,显著增强了内皮细胞的体外增殖、迁移和血管形成能力。ZHANG等^[48]将间充质干细胞衍生细胞外囊泡与水凝胶结合移植到股骨骨折大鼠模型的骨折部位,发现间充质干细胞衍生细胞外囊泡除了增强成骨分化外,还增加了血管内皮生长因子和缺氧诱导因子1 α 的表达。其中,缺氧诱导因子1 α 在促血管生成和增强骨修复中起重要作用。

2.2.3 增强靶细胞的增殖和分化 细胞外囊泡介导的旁分泌信号可以通过影响成骨细胞和破骨细胞来调节骨稳态。研究表明,携带miR-935的间充质干细胞衍生细胞外囊泡可以通过靶向信号转导和转录激活因子1来促进成骨细胞的增殖和分化^[49]。HU等^[50]评估了间充质干细胞衍生细胞外囊泡对骨质疏松的影响,结果显示其通过在体外传递强效促成骨蛋白C型凝集素结构域家族11成员A(C-type lectin domain family 11 member A, CLEC11A)增强了骨髓间充质干细胞从脂肪形成向成骨分化的转变,并抑制破骨细胞的形成。间充质干细胞衍生细胞外囊泡全身给药可通过增强骨形成、减少骨髓脂肪堆积和减少骨吸收来预防骨质疏松导致的骨质流失并维持骨强度^[50]。

2.3 细胞外囊泡的工程化方法 细胞外囊泡作为一种新兴的无细胞疗法,具有良好的生物相容性和低免疫原性,可以较好地克服细胞疗法存在的不足。然而,幼稚细胞外囊泡对治疗药物负载能力低,还存在组织靶向能力不足的问题,此外其药理学机制尚未完全了解^[51]。在过去10年中,工程化细胞外囊泡已开发出表面工程技术,用于将载体运送到特定的目标组织,并探索了将治疗剂装载到细胞外囊泡中的有效装载方法,因此工程化细胞外囊泡具有良好的应用前景^[52]。

2.3.1 表面修饰的工程化方法 表面修饰主要目的是选择性地使细胞外囊泡递送至靶细胞和潜在的组织中实现精准治疗。根据修饰发生在细胞外囊泡分离之前还是之后，可以分为分离前表面修饰和分离后表面修饰。

分离前表面修饰主要包括基因工程、代谢工程和直接母细胞膜工程方法^[53]。基因工程是利用细胞外囊泡膜结合蛋白赋予细胞外囊泡靶向特性，修饰过程中应该考虑到在细胞外囊泡上富集的蛋白质结构域的选择^[54]。因为合适的囊泡膜上蛋白比较有限，一些配体结构与膜蛋白融合表达时不能折叠成有活性的结构^[55]。代谢工程是通过向母细胞培养基中添加叠氮化物标记的代谢物来生成带有叠氮化物基因的细胞外囊泡，从而赋予细胞外囊泡新的成分和功能^[56]。虽然代谢工程可以实现细胞外囊泡的功能化，但很难控制表面结合位点的特异性和效率^[53]。直接母细胞膜工程可以通过使用与细胞膜融合的融合脂质体来实现，从而交换膜成分，这种策略可以将叠氮化物脂质转移到母细胞膜，从而产生含有叠氮化物脂质的细胞外囊泡，并通过点击化学实现功能化^[57]。然而，融合脂质体制剂中的脂质很可能也会进入到细胞外囊泡制剂中，这可能造成不必要的毒性和免疫原性，需要对该方法的安全性方面做进一步评估^[53]。

分离后表面修饰是指在细胞外囊泡分离后用靶向分子对细胞外囊泡表面进行物理修饰或者化学修饰。细胞外囊泡的表面物理修饰可通过膜融合、疏水插入或表面吸附来实现^[52]。细胞外囊泡的脂质双层可以很容易地与具有相似性质的脂质体融合，实现对细胞外囊泡的表面修饰。膜融合可以通过冻融循环或者聚乙二醇完成^[58-59]。冻融循环可能对细胞外囊泡完整性产生潜在负面影响，而聚乙二醇介导的脂质体与细胞外囊泡膜融合不会破坏细胞外囊泡完整性，且可以同时细胞外囊泡执行表面改性和内容物装载^[58-60]。疏水插入也是基于脂质体开发的，该方法允许靶分子使用由磷脂和胆固醇组成的细胞外囊泡膜成分对细胞外囊泡表面进行修饰。相对磷脂而言，胆固醇插入所需孵育温度较低，更适合在细胞外囊泡中应用，但是插入后胆固醇处理的脂质体仅表现出较低的插入脂质保留率，因此疏水插入稳定性问题值得特别评估^[61-62]。表面吸附的方法可以依赖于细胞外囊泡的表面特性，如蛋白质或脂质的头部基团，也可以依赖于细胞外囊泡的表面电荷^[63-64]，该物理方法操作简便且可使用患者来源的细胞外囊泡，但研究相对较少，有待深入探索^[64]。细胞外囊泡表面修饰的化学方法主要是将靶分子共价连接到细胞外囊泡表面来进行靶向递送。利用活化酯可将羧基同氨基共价结合形成酰胺基团，这是常见的蛋白质偶联反应^[65]。除了偶联反应外，还有一大类为生物正交反应。在生物正交反应中，点击化学因其易于操作、较高的反应特异性及反应效率、较低的副反应和生物毒性，成为化学修饰的重要手段^[66-67]。细胞外囊泡的表面修饰工程化方法见表1。

2.3.2 内容物装载的工程化方法 内容物装载是指向细胞外囊泡中装载指定的小分子药物、核酸、蛋白质等内容物分子，将细胞外囊泡打造为药物载体。内容物装载可

表1 | 细胞外囊泡表面修饰的工程化方法

表面修饰	原理	优点	缺点
分离前表面修饰			
基因工程 ^[54-55]	使用细胞外囊泡膜结合蛋白赋予细胞外囊泡靶向特性	实现细胞外囊泡靶向或增加药物活性的潜力	细胞外囊泡富集的蛋白质结构域有限的
代谢工程 ^[53, 56]	向亲本细胞培养基中添加叠氮化物标记的代谢物	轻松实现细胞外囊泡表面功能化	无法控制修饰位点的特异性和效率
直接母细胞膜工程 ^[53, 57]	亲本细胞与叠氮化物修饰的脂质体融合	适用于设计具有各种功能的细胞外囊泡	可能导致潜在的毒性或免疫原性
分离后表面修饰			
膜融合 ^[58-60]	脂质体与细胞外囊泡膜融合以实现表面修饰	可针对特定的药物输送问题进行定制	纯化过程复杂且可能导致免疫原性
疏水插入 ^[61-62]	使用亲脂性分子进行表面修饰	操作简便且灵活可控	需评估疏水插入稳定性问题
表面吸附 ^[63-64]	利用细胞外囊泡一般特性通过吸附进行表面修饰	操作简便且可使用患者来源的细胞外囊泡	研究相对较少
点击化学 ^[66-67]	利用炔烃-叠氮化物加成反应进行表面修饰	可赋予细胞外囊泡靶向性	炔烃修饰方法缺乏位点特异性

以在细胞外囊泡从细胞中分离之前进行，称为内源性内容物装载；也可以在细胞外囊泡分离后进行，称为外源性内容物装载^[12]。内源性内容物装载主要包括亲本细胞的转染和共培养。内容物分子可通过编码DNA被转染到亲本细胞，从而装载到细胞外囊泡中，转染主要通过质粒和病毒媒介实现^[12, 68-69]。转染过程中，基因表达改变和转染剂毒性可能会导致亲本细胞发生变化^[12]。共培养是将亲本细胞与要装载的内容物分子一起孵育，以产生带有这些内容物分子的细胞外囊泡。该方法操作简单，不依赖任何特殊设备，但是内容物分子装载效率较低，且只适用于可轻松通过细胞膜的目标分子^[70]。外源性内容物装载方法较多，包括细胞外囊泡共培养、电穿孔、超声、冻融循环、挤压和表面活性剂辅助渗透等。不同于亲本细胞共培养，细胞外囊泡共培养是指在特定温度下将内容物分子与纯化的细胞外囊泡一起孵育，内容物可通过共培养封装到细胞外囊泡中^[71-72]。亲水的内容物分子很难依靠单纯细胞外囊泡共培养装载到细胞外囊泡中，为了克服细胞外囊泡共培养的限制性，研究者们开发了利用物理刺激或者化学药物改善细胞外囊泡膜通透性的替代方法。电穿孔是使用电脉冲在细胞外囊泡膜上形成孔隙，内容物分子可以通过这些孔隙渗透到细胞外囊泡中^[73]，该方法的装载效率可以通过程序控制，但是内容物分子有形成聚集体的风险^[73]。超声、冻融循环和挤压这些物理手段都可以通过类似的机制将内容物分子封装到细胞外囊泡中^[74]。不同的是，超声处理会导致核酸降解，不适合核酸的封装^[75]；冻融循环会影响蛋白质的活性^[76]；挤压处理的内容物装载效率高，可以产生大小均匀的细胞外囊泡，但是有研究称挤压后的细胞外囊泡膜电位会发生改变，并具有细胞毒性^[77]。表面活性剂如皂苷可以在细胞外囊泡膜上产生孔隙，实现内容物分子的封装^[76]，但是皂苷在体内有溶血活性，负载药物后需要进行彻底净化^[78]。细胞外囊泡的内容物装载工程化方法见表2。

2.4 工程化细胞外囊泡在骨缺损修复中的应用 近年来，利用工程化细胞外囊泡治疗骨缺损相关疾病的研究数量

表 2 | 细胞外囊泡的内容物装载的工程化方法

内容物装载	原理	优点	缺点
内源性内容物装载			
亲本细胞转染 ^[12, 68-69]	将核酸、蛋白质和肽转染到亲本细胞	内容物装载方便稳定	因基因改变和转染毒性导致细胞变化
亲本细胞共同孵育 ^[70]	将亲本细胞与装载分子共同孵育	操作简单	装载效率低且对亲本细胞有毒性
外源性内容物装载			
细胞外囊泡共培养 ^[71-72]	将细胞外囊泡与装载分子共同孵育	操作简单, 细胞外囊泡完整性不变	装载效率低且内容物分子范围有限
电穿孔 ^[73]	电脉冲处理使细胞外囊泡膜上产生孔隙	优化流程, 装载效率高	存在细胞外囊泡和内容物分子聚集风险
超声波 ^[74-75]	超声波处理诱导细胞外囊泡膜损伤	装载效率高	不适用于核酸分子装载
冻融循环 ^[76]	多次冻融处理诱导细胞外囊泡膜损伤	操作简单	装载效率低且存在蛋白变性风险
挤压 ^[77]	挤压处理诱导细胞外囊泡膜损伤	装载效率高, 细胞外囊泡大小均匀	改变细胞外囊泡膜结构并具有细胞毒性
活性剂辅助渗透 ^[76, 78]	表面活性剂处理使细胞外囊泡膜上产生孔隙	装载效率高	载药后需进行彻底净化

增长迅速, 这得益于疾病机制相关研究的完善以及药理学和材料科学的快速发展。骨形态发生蛋白 2 是一种强效骨诱导因子, 其引入为增强细胞外囊泡成骨作用提供了一种现成的策略。间充质干细胞衍生的细胞外囊泡具有骨诱导特性, 但是幼稚间充质干细胞衍生细胞外囊泡在促进骨再生方面效果甚微。为了生成具有增强成骨诱导能力的间充质干细胞衍生细胞外囊泡, HUANG 等^[79] 将编码骨形态发生蛋白 2 基因的慢病毒颗粒转染入骨髓来源基质细胞, 以探索骨形态发生蛋白 2 过表达的工程化细胞外囊泡对骨缺损的再生修复效果, 结果显示这些工程化细胞外囊泡在尺寸分布、标记物表达和内吞特性方面保持了幼稚人骨髓来源基质细胞衍生细胞外囊泡的一般物理和生化特性, 但是它们通过过表达骨形态发生蛋白 2 信号级联的 miRNA, 在体外增强了幼稚人骨髓来源基质细胞的成骨分化潜力^[79]。此外, 与骨髓来源基质细胞衍生细胞外囊泡相比, 骨形态发生蛋白 2 过表达的细胞外囊泡在大鼠颅骨缺损模型中显示出更高的骨再生能力^[79]。工程化细胞外囊泡也可以与支架材料结合起来提高植入支架的生物功能。WEI 等^[80] 从骨形态发生蛋白 2 刺激的巨噬细胞中分离细胞外囊泡, 发现它们可以通过自噬依赖性途径增强骨髓间充质干细胞的成骨分化能力, 并且骨形态发生蛋白 2/ 巨噬细胞衍生细胞外囊泡可以用来修饰钛纳米管植入物以促进成骨。还有团队获取骨髓间充质干细胞来源细胞外囊泡, 通过层层自组装的方式开发了一种骨形态发生蛋白 2 基因激活的脱钙骨基质支架, 免股骨裸缺损实验证明, 基于细胞外囊泡的基因激活的脱钙骨基质支架不仅可以显著促进骨修复, 还能促进血管生成^[81]。SUN 等^[82] 利用小鼠胚胎成纤维细胞作为工具细胞, 制备了工程化骨形态发生蛋白 2 过表达的细胞外囊泡, 并将其封装到明胶甲基丙烯酸酯水凝胶中, 结果显示载有工程化细胞外囊泡的水凝胶显著促进了骨髓间充质干细胞的体外成骨分化, 并改善了体内颅骨缺损处的原位骨再生。

考虑到 miRNA 内容物对细胞外囊泡功能的重要性, 通过在细胞外囊泡中靶向表达选定的 miRNA 来推动工程化细胞外囊泡领域的发展也成为一种潜在可行的策略。为了

验证这一假设, HUANG 等^[83] 设计了工程化人骨髓来源基质细胞衍生细胞外囊泡, 使其具有更高水平的 miR-424, 这是骨形态发生蛋白 2 信号级联的增强剂, 结果显示, miR-424 过表达的人骨髓来源基质细胞衍生细胞外囊泡通过激活 SMAD1/5/8 磷酸化增强了幼稚人骨髓来源基质细胞的成骨分化潜力, 大鼠颅骨缺陷再生骨体积显著增加。LAI 等^[84] 为了研究 miR-26a 在骨再生中的作用, 用 DP7-C 作为转染剂转染骨髓间充质干细胞后, 通过超速离心从 miR-26a 修饰的骨髓间充质干细胞中提取细胞外囊泡, 然后在体外和体内研究中评估工程化骨髓间充质干细胞来源细胞外囊泡对成骨的影响。体外研究发现, 负载 miR-26a 的骨髓间充质干细胞来源细胞外囊泡可增强骨髓间充质干细胞的增殖、迁移和成骨分化能力; 体内研究观察到负载 miR-26a 的骨髓间充质干细胞来源细胞外囊泡可促进小鼠牙周炎的成骨能力并抑制骨质流失^[84]。miR-126 是牙周炎相关递质的转录调节因子之一, 将 miR-126 靶向递送至巨噬细胞可能为治疗牙周炎提供有效的免疫调节策略。LUO 等^[85] 成功构建了负载 miR-126 的 C-X-C 基序趋化因子受体 4 (C-X-C motif chemokine receptor 4, CXCR4) 的细胞外囊泡 (CXCR4-miR-126-EVs), 减少了向巨噬细胞的脱靶递送, 并调节巨噬细胞向抗炎表型转变。在大鼠牙周炎部位局部注射 CXCR4-miR-126-EVs 可有效减少骨吸收和破骨细胞生成, 并抑制牙周炎进展^[85]。

除了骨形态发生蛋白 2 和 miRNA 以外, 研究者们也开发了其他生物活性因子来增强细胞外囊泡的骨缺损再生修复能力。缺氧诱导因子 1 α 在骨骼发育中起着关键作用, 然而缺氧诱导因子 1 α 在常氧条件下迅速降解, 仅在缺氧条件下保持稳定。为此, 研究者们通过基因工程手段将缺氧诱导因子 1 α 亚基功能区的 3 个氨基酸位点突变为 402, 564, 803 位的丙氨酸, 成功构建了突变型缺氧诱导因子 1 α , 突变型缺氧诱导因子 1 α 可以在常氧条件下有效表达功能性蛋白质^[86]。LI 等^[87] 通过腺病毒转染的方式获取了突变型缺氧诱导因子 1 α 修饰的骨髓间充质干细胞来源细胞外囊泡, 并探索了其在治疗早期激素性股骨头缺血性坏死中的作用。与对照组相比, 将突变型缺氧诱导因子 1 α 修饰的骨髓间充质干细胞来源细胞外囊泡注射到坏死区域通过增强成骨和血管生成能力促进了激素性股骨头坏死修复^[87]。突变型缺氧诱导因子 1 α 修饰的骨髓间充质干细胞来源细胞外囊泡也可以负载于 β -磷酸三钙支架材料上, 促进临界尺寸骨缺损区域的新骨再生及新血管生成^[88]。SU 等^[89] 将磷脂酰丝氨酸靶向适体与修复性施万细胞来源细胞外囊泡偶联, 构建可靶向损伤轴突和骨再生的仿生骨膜, 体内外实验证明该骨膜可通过 c-Jun 氨基末端激酶 (c-Jun N-terminal kinase 3, JNK3)/ 丝裂原活化蛋白激酶 (mitogen-activated protein kinase, MAPK) 通路靶向损伤神经, 促进血管生成和骨再生。带有血管内皮生长因子质粒的软骨祖细胞衍生细胞外囊泡具有双重作用, 既可作为成骨诱导基质诱导骨髓间充质干细胞成骨分化, 又可以作为基因载体可控释放血管内皮生长因子基因重塑血管系统, 其介导的骨支架可显著增强大段骨缺损的成骨和血管重塑能力^[90]。纤维蛋白作为组织损伤部



位的普遍性特征成分,是将细胞外囊泡递送到缺损骨骼的理想靶点。有团队通过纤维蛋白靶向肽半胱氨酸-精氨酸-谷氨酸-赖氨酸-丙氨酸 (cysteine-arginine-glutamic acid-lysine-alanine, CREKA) 修饰脂肪来源间充质干细胞衍生细胞外囊泡以增强骨修复,结果显示由于纤维蛋白结合和保留能力得到改善,其在大鼠股骨缺损模型中显著增强了骨修复能力^[91]。淫羊藿苷在炎性骨缺损的治疗中起着重要作用,然而药代动力学研究表明较差的生物利用度限制了其应用^[92]。在此背景下, YU 等^[93]分离了牛奶来源细胞外囊泡并负载了淫羊藿苷,以改善淫羊藿苷的成骨效应,结果显示负载淫羊藿苷的细胞外囊泡可以通过促进信号转导和转录激活因子 5 与 GJA1 启动子的结合,进而促进成骨细胞的增殖和分化,提高小鼠颅骨缺损的骨修复能力。不同来源的工程化细胞外囊泡在骨缺损再生中的应用见表 3。

3 总结与展望 Summary and prospects

在骨缺损再生修复领域,工程化细胞外囊泡表现出了巨大的治疗潜力。尽管细胞外囊泡在再生医学中的应用才刚刚开始,但临床前的测试结果表明,细胞外囊泡的应用将克服基于细胞疗法的局限性以及相关的可能不良反应。基于表面修饰和内容物装载的工程化策略赋予了细胞外囊泡更高的生物相容性、组织靶向性、治疗有效性和安全性,使其有望成为临界骨缺损再生修复的良好选择。

用于细胞外囊泡工程化改造的方法众多,但是应该注意到其对骨缺损相关模型的适应性,避免过度使用,应考虑到工程化细胞外囊泡的实际效用是否值得复杂工程方法的高成本。在解决这些问题之前,需要首先标准化分离和表征技术,但该领域尚未达成共识。在机制研究方面,细胞外囊泡的多样化功能源于其不同的内容物,目前学者们主要关注 miRNA,它们在细胞外囊泡介导的临界骨缺损再生中起着关键作用。然而,在不同的病理情况下不同细胞外囊泡与靶细胞相互作用的关键蛋白质和其他 RNA 的信息尚不明确,探索潜在的治疗机制对于未来工程化细胞外囊泡走向临床研究具有重要意义。尽管工程化细胞外囊泡在应用于骨缺损再生修复过程中仍面临着诸多挑战,但是随着对细胞外囊泡治疗机制理解的不断深入,以及生物医学及相关学科快速发展,相信在不久的将来工程化细胞外囊泡治疗骨缺损将迎来大规模临床应用。

作者贡献: 文章设计和文章撰写为周洋,资料收集为刘可鑫和王得利,通讯作者孙璋负责审核。

利益冲突: 文章的全部作者声明,在课题研究和文章撰写过程中不存在利益冲突。

开放获取声明: 这是一篇开放获取文章,根据《知识共享许可协议》“署名-非商业性使用-相同方式共享 4.0”条款,在合理引用的情况下,允许他人以非商业性目的基于原文内容编辑、调整和扩展,同时允许任何用户阅读、下载、拷贝、传递、打印、检索、超级链接该文献,并为之建立索引,用作软件的输入数据或其它任何合法用途。

版权转让: 文章出版前全体作者与编辑部签署了文章版权转让协议。

出版规范: 该文章撰写遵守国际医学期刊编辑委员会《系统综述和荟萃分析报告规范》(PRISMA 指南)。文章出版前已经过专业反剽窃文献检测系统进行 3 次查重。文章经小同行外审专家双盲外审,同行评议认为文章符合期刊发表宗旨。

表 3 | 工程化细胞外囊泡在骨缺损再生中的应用

工程化策略	发表年份	第一作者	细胞外囊泡来源	模型选择	结果
表面修饰	2020	LIANG ^[81]	骨髓间充质干细胞	兔股骨骨髓缺损	骨形态发生蛋白 2 修饰的骨髓间充质干细胞来源细胞外囊泡通过联合脱钙骨基质支架可增强骨诱导能力并促进骨修复
表面修饰	2022	WU ^[91]	脂肪间充质干细胞	大鼠股骨缺损	CREKA 修饰的细胞外囊泡通过靶向纤维蛋白可增强骨修复
	2022	SU ^[89]	修复性施万细胞	大鼠颅骨缺损	磷脂酰丝氨酸靶向修饰的细胞外囊泡通过 JNK3/MAPK 通路促进神经、血管和骨骼再生
内容物装载	2017	LI ^[87]	骨髓间充质干细胞	兔类固醇诱导的骨缺损	突变缺氧诱导因子 1 α 修饰的骨髓间充质干细胞来源细胞外的囊泡通过增强成骨和血管生成来促进股骨头缺血性坏死修复
亲本细胞培养	2019	WEI ^[80]	巨噬细胞	人骨髓间充质干细胞	骨形态发生蛋白 2 修饰的巨噬细胞来源细胞外囊泡通过自噬依赖性途径可增强人骨髓间充质干细胞成骨分化
亲本细胞转染	2020	HUANG ^[79]	人骨髓来源基质细胞	大鼠颅骨缺损	骨形态发生蛋白 2 修饰的人骨髓来源细胞外囊泡通过增强骨形态发生蛋白 2 信号级联促进骨再生
亲本细胞转染	2020	YING ^[88]	骨髓间充质干细胞	大鼠颅骨缺损	突变缺氧诱导因子 1 α 修饰的骨髓间充质干细胞来源细胞外囊泡通过联合 β -磷酸三钙支架可促进骨再生和血管生成
电穿孔	2021	ZHA ^[90]	小鼠软骨祖细胞系	大鼠桡骨缺损	负载血管内皮生长因子的细胞外囊泡可增强大节段骨缺损的成骨和血管重塑
细胞外囊泡共培养	2023	YU ^[93]	牛奶	小鼠颅骨缺损	负载淫羊藿苷的细胞外囊泡通过促进 STAT5a 与 GJA1 启动子结合可增强骨修复
亲本细胞转染	2023	HUANG ^[83]	人骨髓来源基质细胞	大鼠颅骨缺损	负载 miR-424 的人骨髓基质细胞来源细胞外囊泡通过激活 SMAD1/5/8 磷酸化可增强骨修复
亲本细胞转染	2023	LAI ^[84]	骨髓间充质干细胞	小鼠牙周炎	负载 miR-26a 的骨髓间充质干细胞来源细胞外囊泡可促进实验性牙周炎的成骨能力并抑制骨质流失
亲本细胞转染	2023	SUN ^[82]	小鼠胚胎成纤维细胞	小鼠颅骨缺损模型	骨形态发生蛋白 2 修饰的细胞外囊泡可促进骨髓间充质干细胞的增殖和成骨分化,改善原位骨再生
表面修饰联合内容物装载	2023	LUO ^[85]	293T/17 细胞	大鼠牙周炎	负载 miR-126 的细胞外囊泡可有效减少骨吸收和破骨细胞生成,并抑制牙周炎进展

4 参考文献 References

- MAYFIELD CK, AYAD M, LECHTHOLZ-ZEY E, et al. 3D-Printing for Critical Sized Bone Defects: Current Concepts and Future Directions. *Bioengineering (Basel)*. 2022;9(11):680.
- STAHL A, YANG YP. Regenerative Approaches for the Treatment of Large Bone Defects. *Tissue Eng Part B Rev*. 2021;27(6):539-547.
- BALDWIN P, LI DJ, AUSTON DA, et al. Autograft, Allograft, and Bone Graft Substitutes: Clinical Evidence and Indications for Use in the Setting of Orthopaedic Trauma Surgery. *J Orthop Trauma*. 2019;33(4):203-213.
- SONG X, XU L, ZHANG W. Biomimetic synthesis and optimization of extracellular vesicles for bone regeneration. *J Control Release*. 2023; 355:18-41.
- LIU F, SUN T, AN Y, et al. The potential therapeutic role of extracellular vesicles in critical-size bone defects: Spring of cell-free regenerative medicine is coming. *Front Bioeng Biotechnol*. 2023;11:1050916.
- TAN F, LI X, WANG Z, et al. Clinical applications of stem cell-derived exosomes. *Signal Transduct Target Ther*. 2024;9(1):17.
- KUMAR MA, BABA SK, SADIDA HQ, et al. Extracellular vesicles as tools and targets in therapy for diseases. *Signal Transduct Target Ther*. 2024;9(1):27.

- [8] GREGORY CD, RIMMER MP. Extracellular vesicles arising from apoptosis: forms, functions, and applications. *J Pathol.* 2023;260(5):592-608.
- [9] DIXSON AC, DAWSON TR, DI VIZIO D, et al. Context-specific regulation of extracellular vesicle biogenesis and cargo selection. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2023;24(7):454-476.
- [10] JEPPESEN DK, ZHANG Q, FRANKLIN JL, et al. Extracellular vesicles and nanoparticles: emerging complexities. *Trends Cell Biol.* 2023;33(8):667-681.
- [11] PAN Z, SUN W, CHEN Y, et al. Extracellular Vesicles in Tissue Engineering: Biology and Engineered Strategy. *Adv Healthc Mater.* 2022;11(21):e2201384.
- [12] LIU Q, LI D, PAN X, et al. Targeted therapy using engineered extracellular vesicles: principles and strategies for membrane modification. *J Nanobiotechnology.* 2023;21(1):334.
- [13] CHARGAFF E, WEST R. The biological significance of the thromboplastic protein of blood. *J Biol Chem.* 1946;166(1):189-197.
- [14] WOLF P. The nature and significance of platelet products in human plasma. *Br J Haematol.* 1967;13(3):269-288.
- [15] JOHNSTONE RM, ADAM M, HAMMOND JR, et al. Vesicle formation during reticulocyte maturation. Association of plasma membrane activities with released vesicles (exosomes). *J Biol Chem.* 1987;262(19):9412-9420.
- [16] RAPOSO G, NIJMAN HW, STOORVOGEL W, et al. B lymphocytes secrete antigen-presenting vesicles. *J Exp Med.* 1996;183(3):1161-1172.
- [17] VALADI H, EKSTRÖM K, BOSSIOS A, et al. Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. *Nat Cell Biol.* 2007;9(6):654-659.
- [18] LÖTVALL J, HILL AF, HOCHBERG F, et al. Minimal experimental requirements for definition of extracellular vesicles and their functions: a position statement from the International Society for Extracellular Vesicles. *J Extracell Vesicles.* 2014;3:26913.
- [19] THÉRY C, WITWER KW, AIKAWA E, et al. Minimal information for studies of extracellular vesicles 2018 (MISEV2018): a position statement of the International Society for Extracellular Vesicles and update of the MISEV2014 guidelines. *J Extracell Vesicles.* 2018;7(1):1535750.
- [20] WELSH JA, GOBERDHAN DCI, O'DRISCOLL L, et al. Minimal information for studies of extracellular vesicles (MISEV2023): From basic to advanced approaches. *J Extracell Vesicles.* 2024;13(2):e12404.
- [21] DE SOUSA KP, ROSSI I, ABDULLAHI M, et al. Isolation and characterization of extracellular vesicles and future directions in diagnosis and therapy. *Wiley Interdiscip Rev Nanomed Nanobiotechnol.* 2023;15(1):e1835.
- [22] JIA Y, YU L, MA T, et al. Small extracellular vesicles isolation and separation: Current techniques, pending questions and clinical applications. *Theranostics.* 2022;12(15):6548-6575.
- [23] PARIMON T, GARRETT NE 3RD, CHEN P, et al. Isolation of Extracellular Vesicles from Murine Bronchoalveolar Lavage Fluid Using an Ultrafiltration Centrifugation Technique. *J Vis Exp.* 2018;(141):10.3791/58310.
- [24] FOERS AD, CHATFIELD S, DAGLEY LF, et al. Enrichment of extracellular vesicles from human synovial fluid using size exclusion chromatography. *J Extracell Vesicles.* 2018;7(1):1490145.
- [25] KOH YQ, ALMUGHLLIQ FB, VASWANI K, et al. Exosome enrichment by ultracentrifugation and size exclusion chromatography. *Front Biosci (Landmark Ed).* 2018;23(5):865-874.
- [26] LIANGSUPREE T, MULTIA E, RIEKKOLA ML. Modern isolation and separation techniques for extracellular vesicles. *J Chromatogr A.* 2021;1636:461773.
- [27] STAM J, BARTEL S, BISCHOFF R, et al. Isolation of extracellular vesicles with combined enrichment methods. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 2021;1169:122604.
- [28] HASSANPOUR TAMRIN S, SANATI NEZHAD A, SEN A. Label-Free Isolation of Exosomes Using Microfluidic Technologies. *ACS Nano.* 2021;15(11):17047-17079.
- [29] PETROVA T, KALININA O, AQUINO A, et al. Topographic Distribution of miRNAs (miR-30a, miR-223, miR-let-7a, miR-let-7f, miR-451, and miR-486) in the Plasma Extracellular Vesicles. *Noncoding RNA.* 2024;10(1):15.
- [30] RIKKERT LG, NIEUWLAND R, TERSTAPPEN LWMM, et al. Quality of extracellular vesicle images by transmission electron microscopy is operator and protocol dependent. *J Extracell Vesicles.* 2019;8(1):1555419.
- [31] HÖÖG JL, LÖTVALL J. Diversity of extracellular vesicles in human ejaculates revealed by cryo-electron microscopy. *J Extracell Vesicles.* 2015;4:28680.
- [32] RIDOLFI A, BRUCALE M, MONTIS C, et al. AFM-Based High-Throughput Nanomechanical Screening of Single Extracellular Vesicles. *Anal Chem.* 2020;92(15):10274-10282.
- [33] BACHURSKI D, SCHULDNER M, NGUYEN PH, et al. Extracellular vesicle measurements with nanoparticle tracking analysis- An accuracy and repeatability comparison between NanoSight NS300 and ZetaView. *J Extracell Vesicles.* 2019;8(1):1596016.
- [34] BUSCHMANN D, MUSSACK V, BYRD JB. Separation, characterization, and standardization of extracellular vesicles for drug delivery applications. *Adv Drug Deliv Rev.* 2021;174:348-368.
- [35] MAAS SL, BROEKMAN ML, DE VRIJ J. Tunable Resistive Pulse Sensing for the Characterization of Extracellular Vesicles. *Methods Mol Biol.* 2017;1545:21-33.
- [36] ARAB T, MALLICK ER, HUANG Y, et al. Characterization of extracellular vesicles and synthetic nanoparticles with four orthogonal single-particle analysis platforms. *J Extracell Vesicles.* 2021;10(6):e12079.
- [37] DIMITRIADIS S, DOVA L, KOTSIANIDIS I, et al. Imaging Flow Cytometry: Development, Present Applications, and Future Challenges. *Methods Protoc.* 2024;7(2):28.
- [38] GOMZIKOVA MO, JAMES V, RIZVANOV AA. Therapeutic Application of Mesenchymal Stem Cells Derived Extracellular Vesicles for Immunomodulation. *Front Immunol.* 2019;10:2663.
- [39] LIN Z, XIONG Y, MENG W, et al. Exosomal PD-L1 induces osteogenic differentiation and promotes fracture healing by acting as an immunosuppressant. *Bioact Mater.* 2021;13:300-311.
- [40] VAN DEN AKKER F, VRIJSEN KR, DEDDENS JC, et al. Suppression of T cells by mesenchymal and cardiac progenitor cells is partly mediated via extracellular vesicles. *Heliyon.* 2018;4(6):e00642.
- [41] CHU C, DENG J, SUN X, et al. Collagen Membrane and Immune Response in Guided Bone Regeneration: Recent Progress and Perspectives. *Tissue Eng Part B Rev.* 2017;23(5):421-435.
- [42] REIS M, MAVIN E, NICHOLSON L, et al. Mesenchymal Stromal Cell-Derived Extracellular Vesicles Attenuate Dendritic Cell Maturation and Function. *Front Immunol.* 2018;9:2538.
- [43] GANGADARAN P, RAJENDRAN RL, OH JM, et al. Extracellular vesicles derived from macrophage promote angiogenesis In vitro and accelerate new vasculature formation In vivo. *Exp Cell Res.* 2020;394(2):112146.
- [44] HAN KY, CHANG JH, AZAR DT. MMP14-Containing Exosomes Cleave VEGFR1 and Promote VEGFA-Induced Migration and Proliferation of Vascular Endothelial Cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2019;60(6):2321-2329.
- [45] ZHU Y, ZHANG J, HU X, et al. Extracellular vesicles derived from human adipose-derived stem cells promote the exogenous angiogenesis of fat grafts via the let-7/AGO1/VEGF signalling pathway. *Sci Rep.* 2020;10(1):5313.
- [46] MA J, ZHAO Y, SUN L, et al. Exosomes Derived from Akt-Modified Human Umbilical Cord Mesenchymal Stem Cells Improve Cardiac Regeneration and Promote Angiogenesis via Activating Platelet-Derived Growth Factor D. *Stem Cells Transl Med.* 2017;6(1):51-59.
- [47] LIU X, LI Q, NIU X, et al. Exosomes Secreted from Human-Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Mesenchymal Stem Cells Prevent Osteonecrosis of the Femoral Head by Promoting Angiogenesis. *Int J Biol Sci.* 2017;13(2):232-244.
- [48] ZHANG Y, HAO Z, WANG P, et al. Exosomes from human umbilical cord mesenchymal stem cells enhance fracture healing through HIF-1 α -mediated promotion of angiogenesis in a rat model of stabilized fracture. *Cell Prolif.* 2019;52(2):e12570.
- [49] ZHANG Y, CAO X, LI P, et al. microRNA-935-modified bone marrow mesenchymal stem cells-derived exosomes enhance osteoblast proliferation and differentiation in osteoporotic rats. *Life Sci.* 2021;272:119204.

- [50] HU Y, ZHANG Y, NI CY, et al. Human umbilical cord mesenchymal stromal cells-derived extracellular vesicles exert potent bone protective effects by CLEC11A-mediated regulation of bone metabolism. *Theranostics*. 2020;10(5):2293-2308.
- [51] MURPHY DE, DE JONG OG, BROUWER M, et al. Extracellular vesicle-based therapeutics: natural versus engineered targeting and trafficking. *Exp Mol Med*. 2019;51(3):1-12.
- [52] KOMURO H, AMINOVA S, LAURO K, et al. Advances of engineered extracellular vesicles-based therapeutics strategy. *Sci Technol Adv Mater*. 2022;23(1):655-681.
- [53] RICHTER M, VADER P, FUHRMANN G. Approaches to surface engineering of extracellular vesicles. *Adv Drug Deliv Rev*. 2021;173:416-426.
- [54] DOOLEY K, MCCONNELL RE, XU K, et al. A versatile platform for generating engineered extracellular vesicles with defined therapeutic properties. *Mol Ther*. 2021;29(5):1729-1743.
- [55] KOIJMANS SAA, DE JONG OG, SCHIFFELERS RM. Exploring interactions between extracellular vesicles and cells for innovative drug delivery system design. *Adv Drug Deliv Rev*. 2021;173:252-278.
- [56] WANG M, ALTINOGLU S, TAKEDA YS, et al. Integrating Protein Engineering and Bioorthogonal Click Conjugation for Extracellular Vesicle Modulation and Intracellular Delivery. *PLoS One*. 2015;10(11):e0141860.
- [57] LEE J, LEE H, GOH U, et al. Cellular Engineering with Membrane Fusogenic Liposomes to Produce Functionalized Extracellular Vesicles. *ACS Appl Mater Interfaces*. 2016;8(11):6790-6795.
- [58] SATO YT, UMEZAKI K, SAWADA S, et al. Engineering hybrid exosomes by membrane fusion with liposomes. *Sci Rep*. 2016;6:21933.
- [59] PIFFOUX M, SILVA AKA, WILHELM C, et al. Modification of Extracellular Vesicles by Fusion with Liposomes for the Design of Personalized Biogenic Drug Delivery Systems. *ACS Nano*. 2018;12(7):6830-6842.
- [60] SZEBENI J, MOGHIMI SM. Liposome triggering of innate immune responses: a perspective on benefits and adverse reactions. *J Liposome Res*. 2009;19(2):85-90.
- [61] KOIJMANS SAA, FLIERVOET LAL, VAN DER MEEL R, et al. PEGylated and targeted extracellular vesicles display enhanced cell specificity and circulation time. *J Control Release*. 2016;224:77-85.
- [62] MOLNAR D, LINDERS J, MAYER C, et al. Insertion stability of poly(ethylene glycol)-cholesteryl-based lipid anchors in liposome membranes. *Eur J Pharm Biopharm*. 2016;103:51-61.
- [63] GAO X, RAN N, DONG X, et al. Anchor peptide captures, targets, and loads exosomes of diverse origins for diagnostics and therapy. *Sci Transl Med*. 2018;10(444):eaat0195.
- [64] TAMURA R, UEMOTO S, TABATA Y. Augmented liver targeting of exosomes by surface modification with cationized pullulan. *Acta Biomater*. 2017;57:274-284.
- [65] CHOI ES, SONG J, KANG YY, et al. Mannose-Modified Serum Exosomes for the Elevated Uptake to Murine Dendritic Cells and Lymphatic Accumulation. *Macromol Biosci*. 2019;19(7):e1900042.
- [66] TIAN T, ZHANG HX, HE CP, et al. Surface functionalized exosomes as targeted drug delivery vehicles for cerebral ischemia therapy. *Biomaterials*. 2018;150:137-149.
- [67] LIANG Y, DUAN L, LU J, et al. Engineering exosomes for targeted drug delivery. *Theranostics*. 2021;11(7):3183-3195.
- [68] YANG Z, YANG Y, XU Y, et al. Biomimetic nerve guidance conduit containing engineered exosomes of adipose-derived stem cells promotes peripheral nerve regeneration. *Stem Cell Res Ther*. 2021;12(1):442.
- [69] KOJIMA R, BOJAR D, RIZZI G, et al. Designer exosomes produced by implanted cells intracerebrally deliver therapeutic cargo for Parkinson's disease treatment. *Nat Commun*. 2018;9(1):1305.
- [70] PASCUCCI L, COCCÈ V, BONOMI A, et al. Paclitaxel is incorporated by mesenchymal stromal cells and released in exosomes that inhibit in vitro tumor growth: a new approach for drug delivery. *J Control Release*. 2014;192:262-270.
- [71] BETZER O, PERETS N, ANGEL A, et al. In Vivo Neuroimaging of Exosomes Using Gold Nanoparticles. *ACS Nano*. 2017;11(11):10883-10893.
- [72] DIDOT MC, HALL LM, COLES AH, et al. Exosome-mediated Delivery of Hydrophobically Modified siRNA for Huntingtin mRNA Silencing. *Mol Ther*. 2016;24(10):1836-1847.
- [73] ALVAREZ-ERVITI L, SEOW Y, YIN H, et al. Delivery of siRNA to the mouse brain by systemic injection of targeted exosomes. *Nat Biotechnol*. 2011;29(4):341-345.
- [74] LAMICHHANE TN, JEYARAM A, PATEL DB, et al. Oncogene Knockdown via Active Loading of Small RNAs into Extracellular Vesicles by Sonication. *Cell Mol Bioeng*. 2016;9(3):315-324.
- [75] TENCHOV R, SASSO JM, WANG X, et al. Exosomes—Nature's Lipid Nanoparticles, a Rising Star in Drug Delivery and Diagnostics. *ACS Nano*. 2022;16(11):17802-17846.
- [76] GOH WJ, LEE CK, ZOU S, et al. Doxorubicin-loaded cell-derived nanovesicles: an alternative targeted approach for anti-tumor therapy. *Int J Nanomedicine*. 2017;12:2759-2767.
- [77] XI XM, XIA SJ, LU R. Drug loading techniques for exosome-based drug delivery systems. *Pharmazie*. 2021;76(2):61-67.
- [78] MAJNOONI MB, FAKHRI S, GHANADIAN SM, et al. Inhibiting Angiogenesis by Anti-Cancer Saponins: From Phytochemistry to Cellular Signaling Pathways. *Metabolites*. 2023;13(3):323.
- [79] HUANG CC, KANG M, LU Y, et al. Functionally engineered extracellular vesicles improve bone regeneration. *Acta Biomater*. 2020;109:182-194.
- [80] WEI F, LI M, CRAWFORD R, et al. Exosome-integrated titanium oxide nanotubes for targeted bone regeneration. *Acta Biomater*. 2019;86:480-492.
- [81] LIANG Z, LUO Y, LV Y. Mesenchymal stem cell-derived microvesicles mediate BMP2 gene delivery and enhance bone regeneration. *J Mater Chem B*. 2020;8(30):6378-6389.
- [82] SUN J, LI G, WU S, et al. Engineering preparation and sustained delivery of bone functional exosomes-laden biodegradable hydrogel for in situ bone regeneration. *Compos B Eng*. 2023;261:110803.
- [83] HUANG CC, KANG M, LEUNG K, et al. Micro RNA based MSC EV engineering: Targeting the BMP2 cascade for bone repair. *Front Cell Dev Biol*. 2023;11:1127594.
- [84] LAI S, DENG L, LIU C, et al. Bone marrow mesenchymal stem cell-derived exosomes loaded with miR-26a through the novel immunomodulatory peptide DP7-C can promote osteogenesis. *Biotechnol Lett*. 2023;45(7):905-919.
- [85] LUO H, CHEN D, LI R, et al. Genetically engineered CXCR4-modified exosomes for delivery of miR-126 mimics to macrophages alleviate periodontitis. *J Nanobiotechnology*. 2023;21(1):116.
- [86] YANG C, LIU H, LIU D. Mutant hypoxia-inducible factor 1 α modified bone marrow mesenchymal stem cells ameliorate cerebral ischemia. *Int J Mol Med*. 2014;34(6):1622-1628.
- [87] LI H, LIU D, LI C, et al. Exosomes secreted from mutant-HIF-1 α -modified bone-marrow-derived mesenchymal stem cells attenuate early steroid-induced avascular necrosis of femoral head in rabbit. *Cell Biol Int*. 2017;41(12):1379-1390.
- [88] YING C, WANG R, WANG Z, et al. BMSC-Exosomes Carry Mutant HIF-1 α for Improving Angiogenesis and Osteogenesis in Critical-Sized Calvarial Defects. *Front Bioeng Biotechnol*. 2020;8:565561.
- [89] SU Y, GAO Q, DENG R, et al. Aptamer engineering exosomes loaded on biomimetic periosteum to promote angiogenesis and bone regeneration by targeting injured nerves via JNK3 MAPK pathway. *Mater Today Bio*. 2022;16:100434.
- [90] ZHA Y, LI Y, LIN T, et al. Progenitor cell-derived exosomes endowed with VEGF plasmids enhance osteogenic induction and vascular remodeling in large segmental bone defects. *Theranostics*. 2021;11(1):397-409.
- [91] WU Q, FU X, LI X, et al. Modification of adipose mesenchymal stem cells-derived small extracellular vesicles with fibrin-targeting peptide CREKA for enhanced bone repair. *Bioact Mater*. 2022;20:208-220.
- [92] XU S, YU J, ZHAN J, et al. Pharmacokinetics, Tissue Distribution, and Metabolism Study of Icaritin in Rat. *Biomed Res Int*. 2017;2017:4684962.
- [93] YU X, DONG M, WANG L, et al. Nanotherapy for bone repair: milk-derived small extracellular vesicles delivery of icaritin. *Drug Deliv*. 2023;30(1):2169414.

(责任编辑: ZJU, MZH, ZN, QY)