

细胞外囊泡在肿瘤靶向治疗中的作用及应用

张宁^{1,2,3#}, 谢姝钰^{1,2,3#}, 常国欣⁴, 陈延^{1,2,5}, 王岩⁴, 张静⁶, 邱宏^{1,2,3*}

(1. 中国科学院上海药物研究所糖类药物研究中心, 上海 201203; 2. 中国科学院大学药学院, 北京 100049; 3. 南京中医药大学新中药学院, 江苏 南京 210023; 4. 广东药科大学中药学院, 广东 广州 510006; 5. 华南理工大学化学与化工学院, 广东省功能分子工程重点实验室, 广东 广州 510640; 6. 广州中医药大学青蒿研究中心, 广东 广州 510405)

[摘要] 植物细胞、细菌细胞和哺乳动物细胞均可生成和分泌细胞外囊泡, 囊泡内含有蛋白质、核酸、脂质和小分子代谢物。在发现早期, 细胞外囊泡只被认为是细胞处置细胞废弃物的一种方式, 后发现这些囊泡可在不同细胞之间传递活性物质并改变囊泡受体细胞表型。越来越多的研究证实囊泡是细胞间短程和长程通讯的一种新机制, 是细胞间通讯的新范式。细胞外囊泡具有广泛的生理病理作用, 既可直接用作药物也可作为药物递送载体, 还可作为药物靶标和生物标志物。综述植物、细菌和哺乳动物等不同细胞来源的细胞外囊泡在肿瘤靶向治疗中的作用和应用及工程化策略。

[关键词] 细胞外囊泡; 肿瘤; 靶向治疗

[中图分类号] R730.5

[文献标志码] A

[文章编号] 1001-5094 (2022) 02-0093-23

Effect and Application of Extracellular Vesicles in Targeted Cancer Therapy

ZHANG Ning^{1,2,3}, XIE Shuyu^{1,2,3}, CHANG Guoxin⁴, CHEN Yan^{1,2,5}, WANG Yan⁴, ZHANG Jing⁶, QIU Hong^{1,2,3}

(1. Carbohydrate-based Drug Research Center, Shanghai Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 201203, China; 2. School of Pharmacy, University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China; 3. School of Chinese Materia Medica, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210023, China; 4. School of Chinese Materia Medica, Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou 510006, China; 5. Key Laboratory of Functional Molecular Engineering of Guangdong Province, School of Chemistry and Chemical Engineering, South China University of Technology, Guangzhou 510640, China; 6. The Artemisinin Research Center, Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510405, China)

[Abstract] Plant cells, bacterial cells, and mammalian cells can produce and secrete extracellular vesicles (EVs) encapsulated with proteins, nucleic acids, lipids, and small molecules. At the very beginning of research on EV, EVs were thought to function solely as a way to dispose cellular waste. Later on, EVs were found to be able to carry and transfer bioactive substances between cells and change the phenotype of the recipient cells. More and more studies have confirmed that EVs are novel mediators for short- and long-range intercellular communication and new pattern of intercellular communication. EVs have broad physiological and pathological effects and can serve as diagnostic biomarkers, drugs, drug targets, and drug carriers. In this paper, we review the effect, application, and engineering strategies of EVs from different sources in targeted cancer therapy.

[Key words] extracellular vesicle; cancer; targeted therapy

细胞外囊泡 (extracellular vesicles, EVs) 已被证实可以介导细胞间短程和远程通讯^[1-2], 参与肿瘤、心血管疾病、神经退行性疾病和代谢性疾病等疾病的发生、发展, 具有作为疾病诊断标志物、治疗药物、药物靶标和药物载体的潜能^[3-6]。细胞可以通过

多种生成途径生成和释放 EVs, 但囊泡一经释放, 其生成途径便难于追踪^[7]。目前, 尚无有效的分离方法和明确的分子标志物可以区分不同生成途径产生的囊泡, 这使得难以比较和重复不同实验室报道的 EVs 研究结果, 也难以确定不同生成途径形成的囊泡功能差异^[8-9]。此外, EVs 的命名尚无统一标准^[9]。肿瘤 EVs 在肿瘤发生、发展中主要起两方面的作用: 一是促进肿瘤的生长; 二是帮助建立促肿瘤转移微环境, 促进肿瘤转移^[10-11]。哺乳动物 EVs 在肿瘤发生、发展中的作用及诊疗方面的应用研究最为深入, 细菌等微生物囊泡在肿瘤发生、发展中的作用逐渐

接受日期: 2022-01-22

项目资助: 上海市浦江人才计划资助项目 (No.19PJ1411300)

* **通信作者:** 邱宏, 研究员, 博士生导师;

研究方向: 基础与转化糖科学, 细胞外囊泡生物学及应用;

Tel: 021-50800625; **E-mail:** hongqiu@simm.ac.cn

贡献等同

受到关注^[10-11]。EVs 作为治疗药物和药物输送载体, 目前面临最大的问题是如何重复大量的获得^[3]。食用植物和中草药来源的囊泡可以通过多种机制发挥抗肿瘤作用, 这些囊泡相对容易重复获得, 而且安全, 它们的抗肿瘤作用机制和药物递送作用因而受到极大关注^[12-13]。本文简介哺乳动物 EVs、细菌 EVs 和植物 EVs 的生成、定义、特征、制备、表征、摄取和体内分布与代谢, 重点综述这些囊泡在肿瘤靶向治疗中的作用和应用及其工程化改造策略的研究进展、存在问题, 展望 EVs 在肿瘤靶向治疗中的应用前景。

1 细胞外囊泡与肿瘤的发生、发展

1.1 细胞外囊泡的生成、定义和特征

EVs 是一种由细胞产生的纳米级颗粒, 介导细胞之间的短程与长程通讯, 参与不同生理和病理过程的调控^[14]。1946 年, Chargaff 等^[15] 研究凝血时发现, 高速离心所得的粒子样沉淀物可以缩短血浆的凝血时间, 首次观察到了具有生物活性的 EVs。Wolf^[16] 在 1967 年首次用电镜表征了这些粒子样沉淀的形态, 并将其定义为“血小板尘埃”。随着对 EVs 的了解逐渐深入, 研究者根据 EVs 生成途径的不同将 EVs 分为外泌体 (exosome)、微囊泡 (microvesicle) 和凋亡小体 (apoptotic body)。在细胞中, 早期内体 (early endosome) 向内凹陷, 包裹胞质溶胶 (cytosol) 中的许多物质, 形成腔内囊泡 (intraluminal vesicle), 这时早期内体发展为晚期内体 (late endosome) 即多囊泡体 (multivesicular bodies, MVBs), 当 MVBs 向细胞质膜移动并与之融合时, 释放出的囊泡为外泌体, 其粒径一般为 30~200 nm^[17]; 细胞质膜向外出芽直接从细胞质膜脱落产生的囊泡称为微囊泡, 其粒径一般为 100~1 000 nm^[18]。与外泌体和微囊泡不同, 凋亡小体是在细胞凋亡过程中形成, 粒径一般在 1 000~5 000 nm^[19]。目前的技术手段无法分离不同生成途径产生的囊泡^[20]。根据 2018 年国际细胞外囊泡协会的指南, 通常将 EVs 按粒径大小进行分类^[21], 200 nm 及以下的囊泡称为小细胞外囊泡 (small extracellular vesicles, sEVs), 是目前研究

的主要囊泡类型; 大于 200 nm 的囊泡称为中/大细胞外囊泡 (见图 1)。EVs 主要由脂质、蛋白质、核酸和小分子代谢物组成。虽然不同来源的 EVs 蛋白质组成有所差异, 但是哺乳动物来源的囊泡一般均表达肿瘤易感基因 101 蛋白 (tumor susceptibility gene 101, TSG101), 凋亡连接基因 2 作用蛋白 X (apoptosis linked gene 2 interacting protein X, ALIX), 四次跨膜蛋白 (tetraspanin) 家族 CD9、CD63 和 CD81 等蛋白质, 这些蛋白质可作为 EVs 的生物化学特征标志物^[7,22]。EVs 也表达 ATP 酶、甘油醛-3-磷酸脱氢酶 (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH) 和丙酮酸激酶 (pyruvate kinase, PK) 等多种酶、主要组织相容复合物 (major histocompatibility complex, MHC)-I 和 MHC-II 及热休克蛋白^[7,22]。

1.2 细胞外囊泡的分离、纯化和表征

EVs 的分离纯化技术主要包括超速离心法 (ultracentrifugation, UC)^[23]、聚合物沉淀法 (polymer precipitation)^[24]、切向流过滤法 (tangential flow filtration, TFF)^[25]、非对称场流 (asymmetric flow field fractionation, AF4)^[26]、尺寸凝胶排阻色谱 (size exclusion chromatography, SEC)^[27]、免疫亲和层析 (immunoaffinity chromatography)^[28]。一般 UC 所得的囊泡纯度要高于 SEC 所得的囊泡纯度, 但是后者的囊泡产量更高^[29]。TFF 可以处理大量样品, 而且所得样品的纯度与 UC 所得样品的纯度接近。总之, 上述方法均有一定局限性, 虽然可以分离出具有某些特性的 EVs 群体, 但很难实现外泌体和微囊泡之间的完全分离。因此, EVs 分离纯化的具体条件在研究 EVs 的功能时非常重要。为方便不同实验室结果的比较和促进 EVs 研究的标准化, 目前有研究者提出以 EV-TRACK 这一系统报告 EVs 的分离纯化具体参数和特征^[8,30]。

1.3 细胞外囊泡的转运、摄取和体内分布与代谢

EVs 的释放、转运、摄取和体内生物分布与代谢是研究其生物学功能的基础。在进行这些研究时, 通常使用荧光分子或放射性同位素标记 EVs^[31]。EVs 被供体细胞释放后转运至靶细胞, 可以被靶细胞经由网格蛋白^[32]、小窝蛋白或脂筏介导的胞吞^[33], 吞

噬^[34]和胞饮(巨胞饮、微胞饮等)等不同内吞机制摄取^[35];也可与细胞膜融合将其内含物释放至靶细胞的胞质溶胶^[36]。EVs进入细胞的途径可以通过使用各种内吞途径的特异性抑制剂或遗传学方法确定^[37]。EVs内吞一般通过其表面分子与靶细胞受体相互作用实现,如囊泡表面的末端唾液酸和受体细胞表面硫酸乙酰肝素蛋白聚糖,均为内吞的分子媒介^[38-39]。EVs与靶细胞质膜的融合也需要通过囊泡与质膜上的配体-受体相互作用实现。比如,单核细胞/巨噬细胞产生的囊泡通过囊泡表面的P-选择素糖蛋白配体,与血小板表面的P-选择素结合启动囊泡与细胞的融合^[36]。EVs在被靶细胞摄取之后,多数进入内体和(或)溶酶体释放其内含物,但这与细胞内的pH和脂质种类有关^[40-41]。内体和(或)

溶酶体pH的中性化和胆固醇增加能够抑制囊泡与内体质膜的融合和内含物的释放^[40-41]。受体细胞摄取EVs的效率较低,1h内自发性摄取率仅为1%,但摄取的囊泡30%会被释放到胞质溶胶^[42]。最近也有研究发现,EVs在内吞进入内体之后会通过晚期内体与核膜融合,将内含物释放至核浆中,这一过程由RAB7、囊泡相关膜蛋白相关蛋白A(vesicular associated membrane protein associated protein, VAP-A)和氧化甾醇结合蛋白相关蛋白3(oxysterol binding protein related protein 3, ORP3)形成的复合物介导^[43]。美国食品和药品管理局(Food and Drug Administration, FDA)批准的药物伊曲康唑(itraconazole)和小分子PRR851可以抑制这一过程(见图1)^[44]。

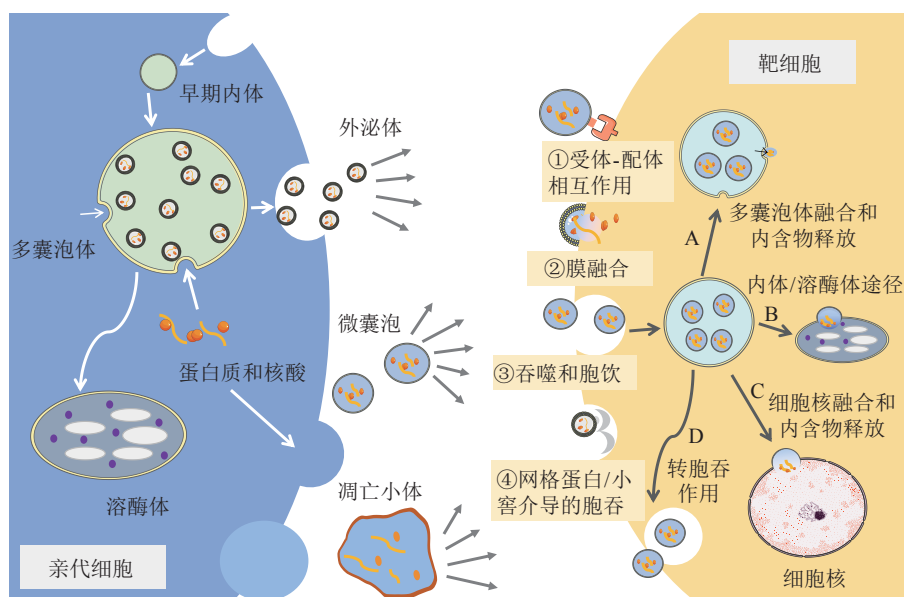


图1 细胞外囊泡的生成、释放、转运、摄取和装载货物的释放

Figure 1 Biogenesis, release, trafficking, uptake and cargo release of extracellular vesicles

EVs在体内的代谢分为2个过程:快速的分布期(distribution phase)与较长的肝和肾清除期(elimination phase)^[45]。研究显示,EVs经小鼠尾静脉注射24h后在肝、脾、肺和胃肠道中滞留最多,EVs的供体细胞类型和给药途径的改变均会影响EVs的生物分布^[45]。Smyth等^[46]研究发现,标记的EVs、人工合成脂质体与由EVs衍生的脂质体体内生物分布和清除率类似。未进入受体细胞的EVs可以通过多种机制被降解清除,比如,巨噬细

胞等免疫细胞和内皮细胞通过吞噬作用,摄取循环血液中的肿瘤EVs并将其降解^[47-48]。生物来源或人工合成的EVs在肝脏中很容易被迅速清除,限制了囊泡在靶细胞、靶组织或靶器官中的积累,而聚乙二醇(polyethylene glycol, PEG)修饰或使用肝摄取抑制剂可增加囊泡在体内的滞留时间^[49]。EVs表达CD47和CD24等吞噬抑制分子,从而避免被吞噬降解^[50]。表面表达CD47的受体信号调节蛋白 α (signal regulatory protein α , SIRP α)的EVs,可逃

脱巨噬细胞的吞噬, 从而提高生物稳定性和在体内的循环时间^[51]。

1.4 细胞外囊泡在肿瘤发生、发展中的作用及机制

肿瘤的发生、发展是正常细胞经历一系列的转化, 突破正常的生存和增殖限制, 变成肿瘤细胞并从原发部位转移扩散的结果。肿瘤细胞的生存、生长和扩散依赖于肿瘤特征性功能的获得, 功能包括细胞基因组的不稳定、促肿瘤炎症反应诱导、非突变性的表观遗传重编程、死亡抵制、细胞增殖信号

的持续维持、肿瘤抑制基因逃避、细胞复制化永生赋能、血管生成诱导和(或)血管的可及、侵袭与转移激活、细胞代谢重编程和免疫监控逃逸等^[52-53](见图2)。除了肿瘤细胞自身的改变, 肿瘤细胞这些功能的获得也需要通过与肿瘤微环境的不同细胞如内皮细胞、周细胞(pericyte)、肿瘤浸润免疫细胞和肿瘤相关成纤维细胞相互通讯以相互赋能和相互驯化^[52-53]。

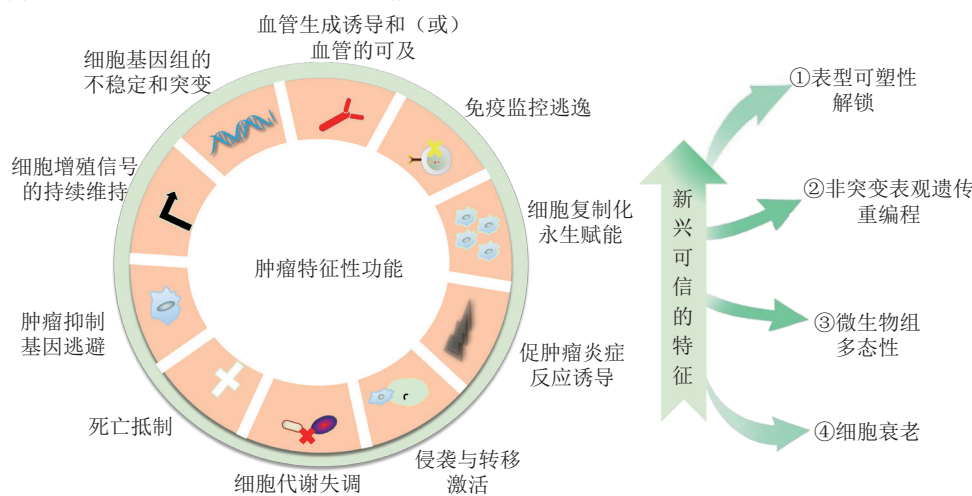


图2 肿瘤的特征性功能

Figure 2 Functional hallmarks of cancer

肿瘤细胞与其所处微环境细胞的相互赋能和相互驯化可以通过 EVs 的短程信息交流实现。2007 年, Lötval 课题组研究发现, 小鼠肥大细胞系 MC/9、原代骨髓肥大细胞和人源肥大细胞系 HMC-1 产生的小 EVs (文中以外泌体 exosome 出现) 中含有信使核糖核酸 (messenger ribonucleic acid, mRNA) 和微小核糖核酸 (microRNA, miRNA) 等小核酸, 但不含 DNA; 这些 mRNA 和 miRNA 在这些肥大细胞之间转运, 而且供体细胞的 mRNA 运送至受体细胞之后能够被翻译成蛋白质^[54]。小 EVs 作为细胞间信息交流介质这一重要现象在不同的生物系统被发现。比如, 2010 年 3 个不同的课题组分别发现, miRNA 可以通过小 EVs 运送至免疫细胞^[55]、内皮细胞^[56] 和肿瘤细胞^[57]; 2008 年表皮生长因子受体变体 III (epidermal growth factor receptor variant III, EGFRv III) 也被发现可以被分选进入胶质瘤细胞产生的囊泡 (文中称作微囊泡 microvesicle),

而且可以经由囊泡在不同细胞之间传送^[57-58]; 2012 年, Wnt 蛋白也被报道可以通过小 EVs 实现远距离转运^[59]; 2015 年 van Rheenen 课题组以具有强转移能力的 MDA-MB-231 和弱转移能力的 T47D 移植瘤为模型发现, MDA-MB-231 产生的小 EVs (以前称作外泌体 exosome) 能转移至 T47D 细胞中, 并改变 T47D 细胞行为, 使其转移能力增强^[60]; 同年 Kalluri 课题组研究发现, 不同肿瘤细胞产生的小 EVs 中均含有磷脂酰肌醇锚定蛋白聚糖 glypican-1, 通过原位移植瘤和转基因小鼠胰腺瘤 (Ptf1a^{Cre/+} LSL-KRas^{G12D/+} Tgfbr^{L/L}, PKT) 模型证实, 小 EVs 中 glypican-1 可以作为胰腺癌的生物标志物, 可区分胰腺癌与良性胰腺疾病和胰腺癌前体病变; 而且作为标志物, glypican-1 灵敏度显著高于常用的胰腺癌生物标志物 CA19-9^[61]。小 EVs 是肿瘤细胞和其所处环境不同细胞相互赋能和相互驯化以获得肿瘤特征性功能的物质媒介, 也可以作为肿瘤诊断和预后的生物标志物^[10,62]。

肿瘤细胞可以通过分泌小 EVs 抑制肿瘤免疫反应。肿瘤细胞能够分泌表达程序性死亡配体-1 (programmed death ligand 1, PD-L1) 的小 EVs, 通过和 CD8⁺ T 细胞表面程序性死亡受体-1 (programmed death receptor-1, PD-1) 结合, 抑制 CD8⁺ T 细胞的肿瘤细胞杀伤作用^[63]。不同的肿瘤细胞分泌 PD-L1 的能力不一样, 前列腺癌细胞 PC-3 和 DU145 要显著强于人源黑色素瘤细胞 SK-MEL-28 和前列腺癌细胞 LNCaP, 敲除 *PD-L1* 或小 EVs 生成的调控蛋白基因 *RAB27a* 均可抑制鼠源前列腺肿瘤细胞 TRAMP-C2 和结肠癌细胞 WC38 移植瘤的生长^[63]。血浆和血浆来源的小 EVs 中的 PD-L1 水平, 黑色素瘤患者要显著高于健康人, 而且接种黑色素瘤细胞的小鼠也要高于不接种黑色素瘤细胞的正常小鼠^[64]。干扰素- γ (interferon- γ , IFN- γ) 处理能够增加囊泡中 PD-L1 的表达; 血浆和血浆来源的小 EVs 中的 PD-L1 水平, 对 PD-1 抗体治疗不响应的黑色素瘤患者高于对治疗有响应的患者^[64]。

肿瘤侵袭和转移依赖在转移目标位点建立促肿瘤转移的微环境, 原发部位的肿瘤细胞通过 EVs 转送物质驯化转移目标部位的内皮细胞、周细胞、免疫细胞和成纤维细胞等正常细胞, 使这些细胞获得肿瘤特征性功能。EVs 的这一远程信息交流作用已经有广泛研究。黑色素瘤细胞分泌的小 EVs 通过诱导骨髓前体细胞高表达 *MNNG HOS* 转化基因蛋白 (MNNG HOS transforming gene, MET), 将其驯化成促进血管生成和促进黑色素瘤细胞转移的表型 CD45⁻c-KIT^{low/+}TIE2⁺^[65]。肿瘤分泌的小 EVs 可以促进血管生成相关基因的表达, 促进血管/淋巴管内皮细胞生长、激活生长信号, 促进肿瘤细胞与内皮细胞的黏附^[66]。肿瘤分泌的小 EVs 也可以破坏血管屏障, 促进肿瘤转移, 比如乳腺癌细胞小 EVs 携带的 miR105 通过抑制血管内皮细胞黏附分子 ZO-1 的表达, 从而破坏血管屏障, 促进乳腺癌细胞的转移^[67]。由乳腺癌和肺癌患者的脑转移灶活组织分泌产生的 EVs, 表达 Wnt 相关蛋白-细胞迁移诱导和透明质酸结合蛋白 (cell migration-inducing and hyaluronan binding protein, CEMIP), 该蛋白可以在脑组织帮助建立促炎的血管微环境, 促进肿瘤细

胞的脑转移^[68]。肿瘤细胞的 EVs 也可招募促进肿瘤发生、发展的巨噬细胞, 在转移靶组织建立促转移微环境, 比如胰腺癌 EVs 能够表达巨噬细胞迁移抑制因子 (migratory inhibitory factor, MIF), 招募肝组织特异性巨噬细胞样细胞 Kupffer 细胞, 促进转化生长因子 β (transforming growth factor β , TGF- β) 的分泌, 进而促使肝星状细胞分泌纤维黏连蛋白 (fibronectin), 在肝建立促纤维化微环境, 将巨噬细胞和中性粒细胞限制在肝, 建立促肿瘤肝转移的微环境^[69]。化疗也可以促进肿瘤细胞分泌促转移的 EVs, 通过建立促转移微环境来促进肿瘤转移, 比如采用 10 mg·Kg⁻¹ 紫杉醇 (paclitaxel, PTX) 治疗小鼠乳腺肿瘤病毒-多瘤病毒中等 T 抗原 (mouse mammary tumor virus-polyoma virus middle T antigen, MMTV-PyMT) 自发性小鼠乳腺癌和 4T1 乳腺癌细胞小鼠移植瘤, 结果发现 PTX 可以通过促进肿瘤细胞分泌含有膜联蛋白 A6 (annexin A6, ANXA6) 的 EVs, 从而促进肺部内皮细胞的激活, 诱导 C-C 基序趋化因子配体 2 (C-C motif chemokine ligand 2, CCL2) 的分泌和 Ly6C⁺CCR2⁺ 单核细胞的扩增, 促进促肿瘤肺转移灶的建立和肿瘤转移; 接受 PTX 和阿霉素 (doxorubicin, DOX) 治疗的乳腺癌患者血浆来源的囊泡中 ANXA6 表达也显著增加^[70]。肿瘤 EVs 上述作用的发挥需要这些囊泡能够被特异性地转运至相应的靶组织, 这些肿瘤 EVs 表达的整合素分子是决定囊泡组织趋向性的关键分子, 整合素 $\alpha_6\beta_4$ 和 $\alpha_6\beta_1$ 介导肺转移, 而 $\alpha_6\beta_5$ 介导脑转移^[71]。

2 不同来源细胞外囊泡在肿瘤靶向治疗中的作用及应用

EVs 属于纳米粒, 纳米粒可以通过高渗透长滞留效应 (enhanced permeability and retention effect, EPR) 实现肿瘤组织的被动靶向^[72]; 同时也可以通过在 EVs 表面装载靶向性分子实现主动靶向。下文就哺乳动物产生的 EVs、细菌囊泡和植物囊泡在肿瘤靶向治疗中的作用及应用做一介绍。

2.1 哺乳动物细胞外囊泡在肿瘤靶向治疗中的作用与应用

肿瘤细胞和其所处微环境的其他细胞可相互赋能和相互驯化, 因此无论是肿瘤细胞来源的 EVs 还

是非肿瘤细胞来源的 EVs 均可促进或抑制肿瘤的发生、发展。在肿瘤治疗中, 需要充分发挥 EVs 对肿瘤发生、发展的抑制作用, 通过工程化修饰提高其肿瘤治疗的靶向性、有效性和安全性。多项研究发现, 肿瘤患者血液中小 EVs 水平较健康人群高^[73-75], 小 EVs 水平越高, 患者的预后越差; 干预 EVs 的生成、释放与摄取可以作为肿瘤靶向治疗的新策略^[76]。

哺乳动物 EVs 的肿瘤治疗作用研究源于 Raposo 等^[77]发现, B 细胞产生的 EVs 含有与抗原多肽分子结合的 MHC-II, 能诱导抗原特异性、MHC-II 限制性的 T 细胞效应。这一发现催生了基于 EVs 的肿瘤免疫靶向治疗研究。树突状细胞是机体内主要的一种抗原呈递细胞, 其产生的 EVs 表达 MHC 分子, 同时也表达 T 细胞共刺激因子。肿瘤抗原处理的树突状细胞分泌的 EVs 能够诱导杀伤性 T 细胞杀死肿瘤细胞^[78]。天然的树突状 EVs 可以通过工程化改造而提高疗效和靶向性。研究显示, 利用小鼠未成熟树突状细胞 (immature dendritic cells, imDCs) 获得表面表达内化 RGD (internalizing Arg-Gly-Glu, iRGD) 肽 (序列为 CRGDK/RGPD/EC) 的囊泡, 这些囊泡可靶向表达整合素 $\alpha_v\beta_3$ 的癌细胞^[79]。由抗原致敏的树突状细胞释放的小 EVs 可以增强癌症的免疫应答^[80]。其他免疫细胞如巨噬细胞和自然杀伤细胞 (natural killer cells, NK) 来源的囊泡也可以激活免疫系统, 抑制肿瘤生长^[81]。最近研究发现, 中性粒细胞来源的小 EVs 也可以通过诱导 HGC27 细胞凋亡, 抑制胃癌细胞 HGC27 裸鼠移植瘤的生长^[82]。

除了免疫细胞之外, 其他非肿瘤来源的 EVs 自身或通过工程化改造也可以抑制肿瘤的生长。KRas^{G12D} siRNA/shRNA 人源包皮成纤维细胞 (human foreskin fibroblast) 产生的小 EVs 能够有效地抑制胰腺癌细胞的生长; 因表达“别吃我”的信号分子 CD47, 这些囊泡可以逃避血液中单核细胞以巨胞饮形式内吞清除, 增长体内循环时间^[83]。骨髓来源的间充质干细胞可生产包载 KRas^{G12D} siRNA 的 GMP 级囊泡, 这些囊泡能够靶向胰腺癌细胞的小鼠移植瘤, 抑制肿瘤的生长^[84]。

鉴于带有与其亲代细胞一样的抗原, 肿瘤细胞 EVs 可以作为疫苗, 通过激活免疫系统抑制肿瘤生

长。但肿瘤细胞 EVs 除了包含肿瘤抗原外, 通常还含有特定的免疫调节蛋白如 PD-L1^[85]、Fas 配体 (Fas ligand, FasL)^[86-88]、肿瘤坏死因子相关的细胞凋亡诱导配体 (tumor necrosis factor related apoptosis inducing ligand, TRAIL)^[88] 和 TGF- β ^[89], 这些蛋白质可以抑制机体的免疫应答反应, 可能削弱肿瘤细胞 EVs 的免疫力, 因此肿瘤细胞 EVs 不宜直接作为疫苗。但可以将肿瘤细胞 EVs 与树突状细胞等免疫呈递细胞孵育, 然后以激活的免疫呈递细胞用于免疫治疗, 比如在体外经肿瘤细胞 EVs 处理的树突状细胞, 在体内能诱导 CD8⁺ T 细胞依赖的抗肿瘤作用^[90]。目前, 肿瘤 EVs 在肿瘤治疗中多数需要经过工程化改造以增强其功能, 比如在囊泡中加入促凋亡的分子 FasL^[91] 或 TRAIL^[92-93]; 或加入具有免疫调节作用的细胞因子或化学趋向因子 IL-18 (interleukin-18, IL-18) 和 IL-2 等^[94-95]; 肿瘤 EVs 也常作为化疗药物的载体, 以增强肿瘤抑制作用, 降低化疗药物毒性, 增强药物在肿瘤组织的渗透性和滞留时间^[96-98]。

2.2 细菌囊泡在肿瘤靶向治疗中的作用与应用

早在 1965 年, 营养缺陷型的大肠埃希菌 (*E. coli*) 就被发现能产生非细胞溶解所形成的球状膜泡^[99], 随后在霍乱弧菌 (*Vibrio cholerae*) 中也发现了细菌外囊泡 (outer membrane vesicles, OMVs)^[100]。大肠埃希菌和霍乱弧菌均为革兰阴性菌, 革兰阳性菌很长一段时间被认为不能产生囊泡, 直到 2009 年才从金黄色葡萄球菌 (*Streptococcus aureus*) 和枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*) 中分离得到囊泡^[101]。OMVs 是细菌在生长过程中外膜向外突起形成的球形纳米囊泡, 粒径大小为 10~300 nm, 主要由磷脂、蛋白质、脂多糖 (lipopolysaccharide, LPS) 和细胞周质等组成。虽然 OMVs 在 60 多年前已被发现, 但它们一直被认为是细菌的代谢垃圾; 后临床研究发现, 急性脑膜炎患者脑脊液中也存在 OMVs^[102]。研究发现, 细菌还可产生外内膜囊泡 (outer inner membrane vesicles, OIMVs)、细胞质囊泡 (cytoplasmic membrane vesicles, CMVs) 和管状膜样结构 (tube-shaped membranous structure, TSMSs)^[103-104]。最近研究发现, 人体循环血液中有细菌来源的 EVs, 这些囊泡可能是不同组织定植细菌介导跨器官信息

交流的重要分子媒介^[105]。

2.2.1 细菌囊泡的生成与制备 细菌囊泡主要通过膜起泡 (membrane blebbing) 和内溶素引起的细胞死亡 (endolysin-triggered cell death) 2 种途径生成^[103]。铁限制、假单胞菌奎诺酮信号 (*Pseudomonas* quinolone signal, PQS)、疏水性分子和抗生素可以促进外膜起泡; 而抗生素、DNA 损害物质和肽聚糖 (peptidoglycan, PG) 降解酶则通过引起爆发性细胞裂解 (explosive cell lysis) 或引发出泡性细胞死亡, 从而促进囊泡产生^[103] (见图 3)。LPS、脂蛋白 (lipoprotein, Lpp) 和磷脂均参与了囊泡生成的调控, 其中 LPS 的电荷和结构主要与 OMVs 的生成和蛋白质组成有关。LPS 是革兰阴性细菌的基本结构单元, 也是细胞表面发现的含量最丰富的抗原, 在大肠埃希菌和沙门氏菌属 (*Salmonella*) 的外膜, LPS 占比高达 75%。鼠伤寒沙门氏菌 (*Salmonella typhimurium*) 在过表达具有催化活性的脂质 A 糖链 3-O-位脱酰基酶 PagL (PhoP/PhoQ induced lipase) 后, OMVs 生产增多, 产量是其野生型菌株的 4 倍^[106]; 但另一项报道发现敲除 *pagL* 后, 囊泡生成没有显著改变, 分别敲除 *pagC* 和 *pagP* 后, 囊泡生成分别减少至原来的 13.9% 和 23.0%^[107]。在大肠埃希菌中, 负责外膜外侧磷脂聚集的新脂蛋白 I (new lipoprotein I, Nlp I) 和外膜脂非对称维持蛋白 E (maintenance of OM lipid asymmetry E, mlaE) 同时被敲除 (*ΔmlaEΔNlp I*) 后, OMVs 的生成较野生菌株高约 30 倍^[108]。囊泡释放的外膜部位几乎没有脂蛋白键, 而附着于肽聚糖层的脂蛋白数量减少会促使细菌 OMVs 形成^[109]。细菌鞭毛蛋白也能调控 OMVs 释放, 鞭毛合成缺失的细胞 OMVs 生成减少^[110]。

细菌 EVs 一般通过结合差速离心、过滤和梯度离心分离纯化, 值得注意的是, 离心参数和过滤滤膜孔径均可影响其纯化效果^[111]。综合运用不同原理的分离纯化方法, 比如采用超滤、分子排阻色谱和密度梯度离心相结合的方法进行分离富集可以增加细菌 EVs 的产量并提高纯度^[112]。

2.2.2 细菌囊泡介导的肿瘤治疗 肠道菌等细菌能够促进或抑制肿瘤的发生、发展, 细菌囊泡在这一过

程中起重要作用, 但目前研究较少^[113-114]。细菌囊泡可以促进细菌生存, 运送细菌毒素、抗生素耐受蛋白和信号分子等物质并介导跨界信息交流^[115]; 细菌囊泡递送毒素的同时也会激活宿主免疫系统, 产生强烈的炎症反应, 一方面可以促使肿瘤的免疫清除, 另一方面也会对靶组织产生免疫毒性。

大肠埃希菌 K-12 W3110 *E. coli* 是广泛用于细菌囊泡研究的菌株。研究发现, 该大肠埃希菌脂质-A 合成酶敲除株 *ΔmsbB* K-12 W3110 *E. coli* 产生的囊泡能够选择性地靶向小鼠结肠癌 CT-26 移植瘤, 并在瘤组织滞留; 这些囊泡可刺激 T 细胞和 NK 细胞分泌 IFN- γ , 激活机体先天免疫系统并抑制肿瘤生长, 从肿瘤接种后第 7 天开始静脉给药, 每次 5 μg , 3 天 1 次, 给药 4 次即可清除结肠肿瘤, 更重要的是这些小鼠再次接种肿瘤细胞不能形成移植瘤, 提示囊泡治疗产生了免疫记忆; 该囊泡也能抑制小鼠 WC38 结肠癌细胞移植瘤的生长、抑制小鼠乳腺癌细胞 4T1 和黑色素瘤细胞 B16BL6 的肺转移^[116]。大肠埃希菌 K-12 W3110 *E. coli* 和肠道沙门氏菌 (*Salmonella enterica*) 的囊泡静脉给药, 每次 5 μg , 3 天 1 次, 给药 4 次也可清除小鼠结肠癌细胞 CT-26 的移植瘤^[116]。革兰阳性菌金黄色葡萄球菌及其脂磷壁酸 (lipoteichoic acid, LTA) 缺失突变株和嗜酸乳杆菌 (*Lactobacillus acidophilus*) 产生的囊泡也能抑制 CT-26 移植瘤的生长^[116]。细菌囊泡也可以作为免疫佐剂。比如, 大肠埃希菌 K-12 W3110 *E. coli* 囊泡以溶菌素和高 pH 处理, 可降解其中脂质-A, 减轻毒性, 处理后作为免疫佐剂与黑色素瘤 EVs 共同免疫黑色素瘤细胞 B16F10 移植瘤荷瘤小鼠, 可以激发 Th-1 型 T 细胞免疫并诱导抗肿瘤 EVs IgG 抗体产生, 杀伤肿瘤细胞, 大肠埃希菌囊泡效果比经典佐剂要好, 而且能够增强 PD-1 抗体的疗效, 实验过程中也未观察到系统毒性^[117]。大肠埃希菌 BL21 来源的囊泡能特异性地靶向乳腺癌细胞 4T1 小鼠移植瘤组织并能够促使肿瘤微环境中巨噬细胞由 M2 向 M1 转化, 但是其静脉注射后容易被抗体依赖的途径清除, 同时也会产生免疫毒性; 采用磷酸钙覆盖囊泡表面的方法可以克服囊泡静脉注射给药引发的抗体依赖性清除和免疫毒性, 增强肿瘤治疗效果^[118]。

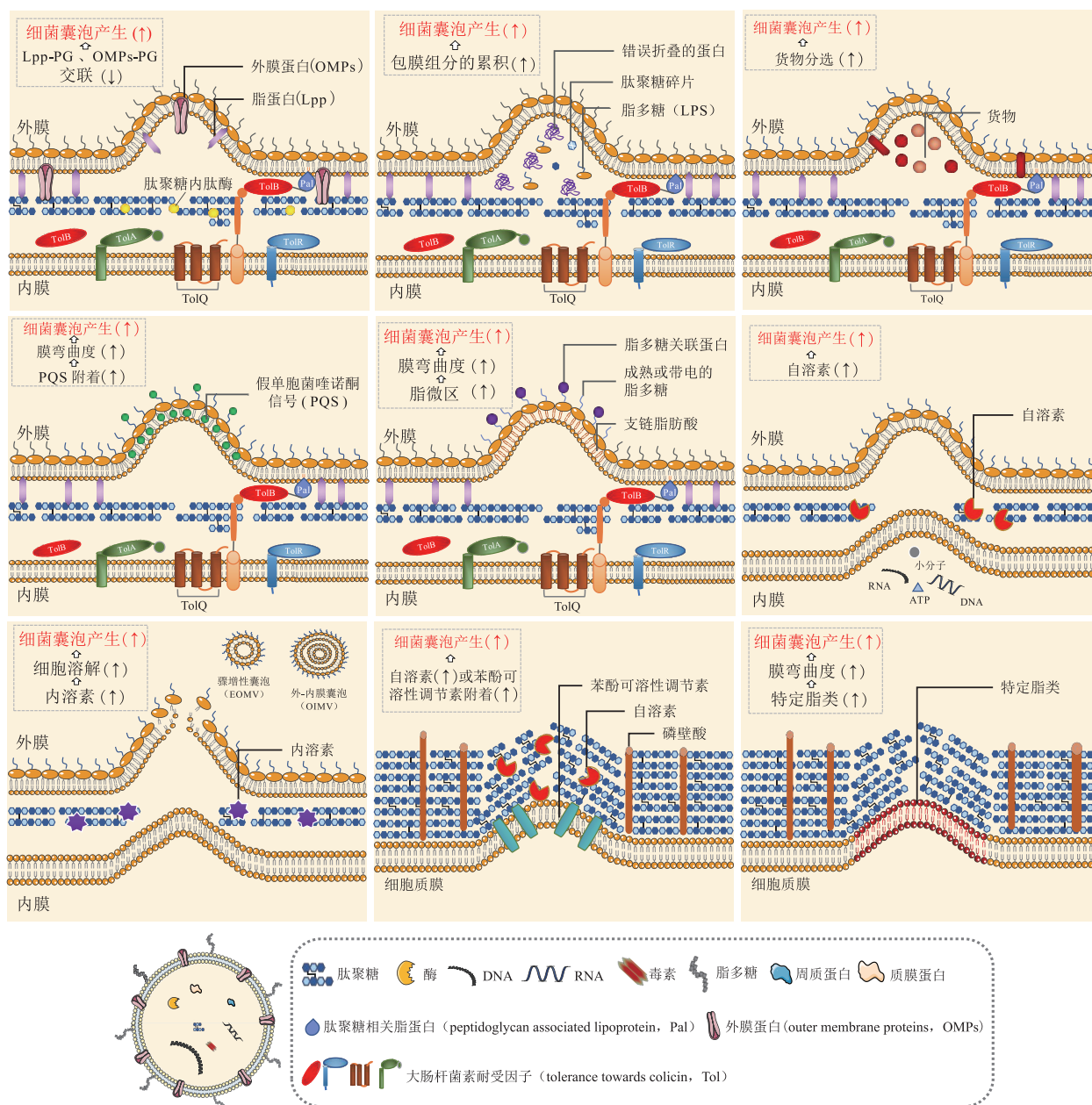


图3 细菌囊泡及其生成机制

Figure 3 Bacterial EVs and the underlying mechanism of biogenesis

益生菌副干酪乳杆菌 (*Lacticaseibacillus paracasei*) PC-H1 能够产生粒径约 200 nm 的囊泡 LpEV, 结肠癌细胞能摄取这些囊泡。LpEV 在体外可以抑制结肠癌细胞 HCT116、SW1116 和 SW620 迁移和侵袭, 还可通过激活 PDK1/AKT/Bcl2 通路诱导结肠癌细胞凋亡。将结肠癌细胞 HCT116 (1.5×10^6 个细胞) 单独或与 LpEV (40 μg) 同时接种到 BALB/c 裸鼠, 结果显示 LpEV 能显著抑制结肠癌

细胞 HCT116 小鼠移植瘤生长^[119]。

2.3 植物细胞外囊泡在肿瘤靶向治疗中的作用与应用

植物 EVs 的可能来源包括胞外阳性细胞器 (exocyst-positive organelle, EXPO)、多囊泡体 (multivesicular body, MVB)^[120]、液泡 (vacuole) 和自噬小体 (autophagosome) (见图 4)^[121]。来源于非原质体液 (anoplasmic fluid) 的囊泡称为植物 EVs, 由组织破碎 (tissue rupture) 液所得的囊

泡称作植物纳米囊泡 (plant derived nanovesicles, PDNVs) [122]。不同植物中囊泡的粒径不同, 即使同一植物中也存在不同粒径的囊泡。拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*) 叶片质外体汁液 (apoplastic fluid) 离心制备囊泡, 分别得到直径为 150 nm 和 10~17 nm 的杯状 EVs [123]; 从本氏烟草 (*Nicotiana benthamiana*) 叶片质外体汁液中分离提取的囊泡直径介于 30~220 nm 之间, 平均为 (117±9) nm [124]; 而从向日葵 (*Helianthus annuus* L.) 种子离心制备所得囊泡直径在 30~150 nm 之间, 形状为杯状 [125]。多组学分析结果发现, 植物来源的囊泡主要含有小核酸、蛋白质、脂质 (主要是磷脂酸、磷脂酰胆碱和磷脂酰乙醇胺) 和小分子代谢物 [126]。在植物中 EVs 可以在细胞间运输多种物质, 促进植物的生长发育, 参与免疫信号传递过程中的蛋白质运输和特定 RNA 的选择性装载, 建立和稳固植物细胞与细菌等微生物的共生关系 [127]。

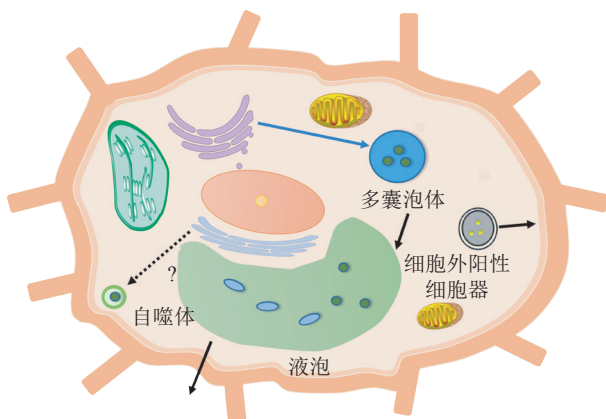


图4 植物细胞外囊泡生成机制

Figure 4 Underlying mechanism of plant EVs biogenesis

植物 EVs 作为一种植物活性成分, 本身可以通过多种机制抑制肿瘤的生长; 同时也可以作为药物载体递送肿瘤治疗药物。植物 EVs 抑制肿瘤生长可以通过诱导肿瘤细胞凋亡和激活宿主免疫系统等作用实现。

2.3.1 免疫调节作用 人参 (*Panax ginseng* CAMey) 来源的新型 EVs 样纳米粒 (ginseng derived nanoparticles, GDNPs) 能够显著促进 M2 (CD11b⁺F4/80⁺CD206⁺) 向 M1 (CD11b⁺F4/80⁺CD86⁺) 表型的极化并产生生活

性氧 (reactive oxygen species, ROS), 导致小鼠黑色素瘤细胞凋亡增加, 显著抑制荷瘤小鼠黑色素瘤的生长, 增加肿瘤组织中 M1 巨噬细胞; GDNPs 诱导的巨噬细胞极化很大程度上取决于 Toll 样受体 4 (Toll like receptor 4, TLR4) 和髓样分化抗原 88 (myeloid differentiation factor 88, MyD88) 信号。GDNPs 还促进 M1 巨噬细胞分泌肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor α , TNF- α)、IL-12 和 IL-6 等炎症因子 [128]; 也促进极化的 M1 巨噬细胞分泌 CCL5 和 CXCL9, 诱导 T 细胞朝肿瘤组织募集, 增强 PD-1 抗体的疗效 [129]。因此, GDNPs 可能作为癌症免疫治疗的一类新型纳米药物。

2.3.2 细胞增殖和凋亡调控作用 采用差速离心和葡萄糖梯度离心所得天冬囊泡 (*Asparagus cochinchinensis* nanovesicles, ACNVs) 含有脂质、核酸和蛋白质, 能通过诱导细胞凋亡抑制肝癌细胞增殖, 而对正常肝细胞的损伤较小; 可能因为植物 EVs 不表达 CD47 等“别吃我”信号, 这些囊泡在体内被快速清除, PEG 修饰能够显著降低囊泡的清除速率 [130]; ACNVs 和 PEG 修饰的 ACNVs 在 200 mg·kg⁻¹ 剂量下均能显著抑制 HepG2 裸鼠移植瘤的生长, 但 PEG 修饰的 ACNVs 效果优于 ACNVs, 给药组肿瘤组织中脱氧核糖核苷酸末端转移酶介导的缺口末端标记 (terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling, TUNEL) 着色显著高于对照组, 说明囊泡主要通过诱导细胞凋亡发挥作用; 与对照组相比, 给予 PEG 修饰的 ACNVs 的小鼠体质量无明显变化, 而给予未修饰 ACNVs 的小鼠体质量显著降低, 但 ACNVs 对心、肝、脾、肺和肾组织均无明显的急性毒性 [130]。

从朝鲜树参 (*Dendropanax morbifera*)、赤松 (*Pinus densiflora*)、北美香柏 (*Thuja occidentalis*) 和日本扁柏 (*Chamaecyparis obtusa*) 树干汁液分离得到了 DM-EVs、PD-EVs、TO-EVs 和 CO-EVs。乳腺癌细胞 MDA-MB-231 和 MCF7 主要通过小窝蛋白介导的内吞作用摄取这些囊泡, 而正常乳腺细胞 MCF10A 则通过网格蛋白和小窝蛋白介导的胞吞途径、小泡饮和吞噬作用摄取这些囊泡。DM-EVs 和 PD-EVs 对乳腺肿瘤细胞 MDA-MB-231 和 MCF7、皮肤肿

瘤细胞 A431 均有细胞毒作用, 而对正常乳腺细胞 MCF10A 和正常皮肤细胞 HNF 的细胞毒作用相对较弱, 且 DM-EVs 作用强于 PD-EVs, TO-EVs 和 CO-EVs 无显著作用; DM-EVs 和 PD-EVs 单独使用作用不如顺铂, 但二者联用的效果强于顺铂, 而且比顺铂具备更好的肿瘤细胞偏好性杀伤作用^[131]。

从甜橙 (*C. sinensis*)、苦橙 (*C. aurantium*)、柠檬 (*C. limon*) 和葡萄柚 (*C. paradisi*) 分离出的微米级 (MV) 和纳米级囊泡 (NV) 可特异性抑制乳腺癌细胞 MCF7、人黑色素瘤细胞 A375 和肺腺癌细胞 A549 的增殖, 对人正常皮肤角质形成细胞 HaCat 的生长没有影响; 葡萄柚囊泡能够抑制 G₀/G₁ 和 G₂/M 细胞周期的转变, 促进细胞周期抑制剂 p21 的上调, 降低 Cyclin B1 的蛋白表达和 G₂/M 检查点关键调节因子 Cyclin B2 的转录水平; 葡萄柚囊泡还通过激活多聚 ADP-核糖聚合酶-1 (poly-ADP-Ribose polymerase-1, PARP-1) 而引发 A375 细胞凋亡, 抑制 AKT 和细胞外信号调节激酶 (extracellular signal regulated kinase, ERK) 信号通路的传导, 从而降低细胞间黏附分子 1 (intercellular adhesion molecule-1, ICAM-1) 和组织蛋白酶 (cathepsins) 的表达, 进而抑制肿瘤细胞迁移^[132]。肺癌、结肠癌和白血病细胞经柠檬囊泡 (limon derived extracellular vesicles, LDEVs) 处理后, 促凋亡分子 Bad 和 Bax 的 mRNA 水平增加, 而促生存分子如生存素 (survivin) 和 Bcl-xL 的表达降低; LDEVs 在体内激活 TRAIL 介导的细胞凋亡, 抑制参与血管生成的细胞因子分泌, 如血管内皮生长因子-A (vascular endothelial growth factor A, VEGF-A)、IL-6 和 IL-8, 强烈地抑制肿瘤的生长^[133]。LDEVs 的抗肿瘤作用部分是通过抑制脂质代谢通路关键酶乙酰辅酶 A 羧化酶 (acetyl-CoA carboxylase, ACACA) 的表达实现; 沉默 ACACA 可以抑制细胞生长和诱导细胞凋亡, 该作用是通过抑制丝裂原激活蛋白激酶 (mitogen activated protein kinase, MAPK) 信号传导和促进 Bad 介导的细胞凋亡实现; LDEVs 只抑制结肠腺瘤细胞 SW480、慢性髓系淋巴瘤细胞 LAMA84 和多发性骨髓瘤细胞 MM1 的生长, 但不抑制人骨髓基质细胞 HS-5 的生长, 因为 LDEVs 只

抑制这些肿瘤细胞中 ACACA 的表达, 但不影响 HS-5 中 ACACA 的表达^[134]。LDEVs 以浓度依赖的方式抑制胃癌细胞 AGS、BGC-823 和 SGC-7901 的生长, 很可能通过诱导 ROS 生成, 上调生长阻滞 DNA 损伤可诱导蛋白 45a (growth arrest and DNA damage inducible alpha, GADD45a) 的表达, 使胃癌细胞周期阻滞于 S 期并诱导胃癌细胞凋亡; 体内实验也表明, SGC-7901 小鼠移植瘤的体质量明显减轻, 而且系统毒性较小^[135]。

苦瓜 EVs (bitter melon extracellular vesicles, BMEVs) 可以抑制口腔鳞状细胞癌 (oral squamous cell carcinoma, OSCC) 细胞 CAL-27 和 WSU-HN6 的生长, 这一作用是通过诱导肿瘤细胞 S 期细胞周期停滞和细胞凋亡实现; 肿瘤细胞凋亡的诱导依赖于 ROS 的产生和 JUN 蛋白的上调; BMEVs 显著下调了 NOD 样受体家族含 pyrin 结构域 3 炎症小体 (NOD-like receptor family, pyrin containing domain 3, NLRP3) 的表达, 这一作用与 BMEV 中所含 RNA 部分片段有关; 5-氟尿嘧啶 (5-fluorouracil, 5-FU) 广泛用于癌症治疗, 但 5-FU 介导的 NLRP3 激活使得 OSCC 细胞对 5-FU 产生耐药性; BMEVs 在体内和体外均与 5-FU 发挥协同作用, 克服细胞对 5-FU 的耐药, 抑制 OSCC 细胞生长, 这一作用与 BMEVs 抑制 NLRP3 的表达有关^[136]。

2.3.3 肿瘤炎症反应抑制作用 大蒜囊泡 (garlic derived vesicles, GDVs) 能被肝癌细胞 HepG2 摄取, 用胰蛋白酶降解其表面蛋白质后, 肝癌细胞 HepG2 对 GDVs 的摄取显著减少; 甘露糖特异性结合蛋白 II 凝集素和 CD98 之间的直接相互作用在细胞对 GDVs 的摄取过程中起重要作用; 阻断 CD98 受体可显著降低 HepG2 细胞对 GDVs 的摄取; 在 HepG2 细胞中, GDVs 通过 LPS 诱导的促炎因子 IFN- γ 和 IL-6 表达, 发挥抗炎作用^[137]。炎症反应可以促进肿瘤的发生、发展和转移^[138], 因此 GDVs 有可能用于肿瘤治疗。

2.3.4 抗肿瘤转移作用 在 3D 微流体模型中, 朝鲜树参 (*Dendropanax moribifera*) 树干汁液来源的囊泡 DM-EVs 可抑制肿瘤相关成纤维细胞 (cancer associated fibroblast, CAF) 的生长, 但对正常成纤

维细胞的生长抑制作用较弱;此外,DM-EVs与黑色素瘤 B16BL6-EVs 同时给药、B16BL6-EVs 预处理后 DM-EVs 多次给药或 DM-EVs 预处理后加入 B16BL6-EVs, DM-EVs 在 $1 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ 或 $10 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ 时,肿瘤相关成纤维细胞的生长均被显著抑制;这些作用可能与 DM-EVs 引起整合素和胶原蛋白等细胞外基质蛋白表达下调有关^[139]。

3 细胞外囊泡的工程化改造

EVs 具有良好的生物相容性,可以通过多种机制抑制肿瘤生长,但在实际应用中发现,EVs 作为肿瘤靶向治疗药物或药物载体仍存在稳定性差、靶

向性低和易被代谢清除等问题^[140]。为此,研究者对 EVs 进行工程化改造以弥补天然 EVs 在靶向性、有效性和代谢清除等方面的不足;改造既可以在囊泡内腔也可以在囊泡表面进行,但通常在囊泡内腔和囊泡表面 2 个层面同时进行(见图 5)。

3.1 细胞外囊泡内腔货物包装

EVs 货物的包装可以通过操控囊泡内含物的细胞分选系统载入^[141-144],也可以在 EVs 生成释放后将货物载入分离纯化的囊泡,因此,EVs 货物包装既可以直接通过物理化学技术包装到 EVs,也可以间接地通过亲代细胞遗传工程修饰将特定的分子包装到 EVs。

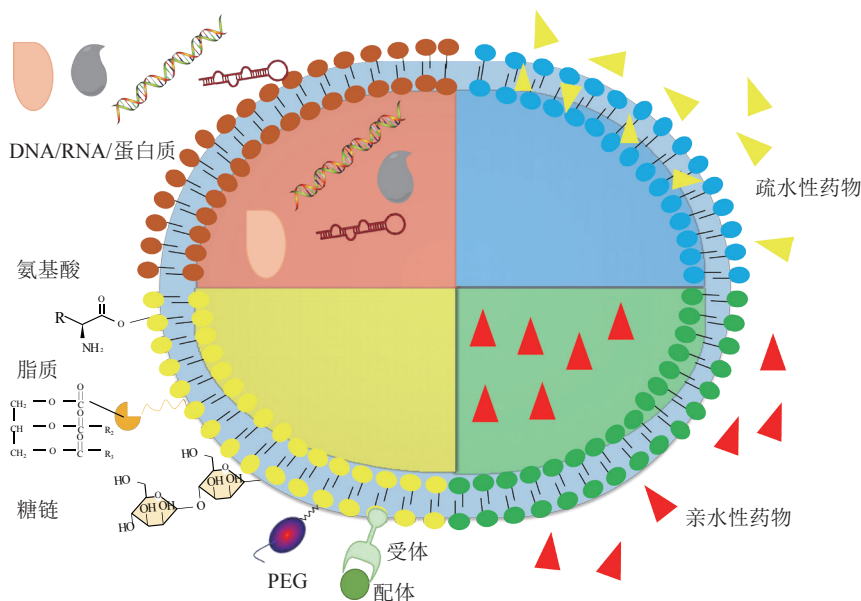


图 5 细胞外囊泡工程化改造的策略和方法

Figure 5 Strategy and method for EVs engineering

3.1.1 基于亲代细胞的细胞外囊泡货物包装 通过遗传工程修饰,利用亲代细胞中 EVs 货物的分选途径,将目标分子包装入 EVs,转染和(或)转导是一种常用的包装方法。质粒和病毒是在靶细胞中表达目标分子的常用分子生物学工具(见图 6)。在转染质粒或转导病毒后,产生 EVs 的亲代细胞可以表达相应的核酸和蛋白质等分子。比如,笔者团队利用过表达血管紧张素转换酶 2 (angiotensin converting enzyme 2, ACE2) 的 HEK293 细胞生产了表达 ACE2 的 EVs^[145]。囊泡也可以作为蛋白质的输送载体。在亲代细胞中以光响应可切割多肽作为连接

子,表达凋亡蛋白 (apoptin) 与 EVs 膜蛋白质 CD9 的融合蛋白,细胞生成的囊泡能包装该融合蛋白,光照后凋亡蛋白即被释放^[146]。为了测试骨髓基质细胞 (marrow stromal cells, MSCs) EVs 是否可以用作输送抗肿瘤 miRNA 的载体, Katakowski 等^[147] 用 miR-146b 表达质粒转染 MSC, 并收集 MSC 释放的 EVs, 发现获得的 EVs 可显著降低胶质瘤细胞的异种移植瘤生长速度。脂肪来源的间充质干细胞和肿瘤细胞等不同细胞经转染或转导表达 miRNA 的表达载体后,均能产生带有相应 miRNA 的 EVs。比如脂肪间充质干细胞在转染表达 miR-122 的质粒后,能够生成

表达 miR-122 的 EVs, 而且瘤内注射该囊泡能够增强肝癌细胞对索那非尼的响应^[148]。细胞在转染寡核苷酸之后产生的 EVs 也携带转染入细胞的寡核苷酸, 比如乳腺癌细胞 4T1、肝癌细胞 HepG2 和卵巢癌细胞 SKBR3 在经脂质体 lipofectamine 2000 转染 Cy5-anti-miR-21 后产生的 EVs 载有 Cy5-anti-miR-21, 而且这些囊泡还能够抵抗癌细胞对 DOX 的耐药性^[149]。目前, 有多种基因工程方法被用来增加核酸在囊泡内的富集^[150], 比如将囊泡标志物分子基因与 RNA 结合蛋白基因连接在一起表达融合蛋白, 可以将 RNA 分子富集在囊泡^[151]。小分子化合物与亲代细胞孵育产生的 EVs 也可以包载小分子化合物如 DOX^[152]。

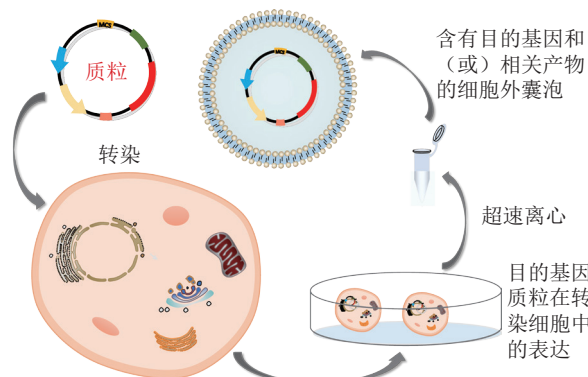


图 6 基于亲代细胞遗传修饰的细胞外囊泡货物包载
Figure 6 EVs cargo encapsulation based on genetic engineering in the parental cells

3.1.2 基于物理化学技术的细胞外囊泡货物包载 物理化学方法包括共孵育、电转、化学转染、超声、挤压、冻融循环、去污剂破膜和低渗透析等, 其中共孵育、电转、化学转染和超声是常用的方法。

共孵育是常用的小分子货物包载方法, 通过将靶分子与囊泡孵育, 利用 EVs 膜两侧的靶分子浓度梯度, 促使靶分子渗透进入囊泡^[153]。EVs 是脂质包裹的中空腔结构, 表面是疏水性的, 一些脂溶性的分子可以通过相似相溶的原理与 EVs 共孵育后包载入囊泡, EVs 的载药效率主要取决于药物分子的疏水性。比如, 疏水性的姜黄素与小鼠淋巴瘤细胞 EL4 产生的 EVs 共孵育被装入囊泡, 可提高其溶解性和稳定性, 体内给药后能够提高姜黄素的生物利用度^[153]。从甘蓝 (cabex) 和红甘蓝 (rabex) 中提取的纳米囊泡能够促进哺乳动物细胞 (HaCaT 和

HDF) 的增殖而不会引起细胞毒性; DOX 与红甘蓝纳米囊泡共孵育可将 DOX 包载到囊泡中, 且所得囊泡能有效抑制结肠癌细胞增殖^[154]。

电转技术是通过悬浮在缓冲液中的 EVs 施加电场, 使 EVs 膜产生瞬时孔隙, 随后促进药物或核酸通过孔隙扩散到 EVs 内部, 将相关分子包载到 EVs 内, 载药过程结束后, 囊泡膜的完整性恢复^[155]。DNA 经由电转在 EVs 的包载率与 DNA 大小和囊泡的粒径有关, 1 000 bp 以上的 DNA 包载率仅为 250 bp 的 DNA 包载率的 1/10, 可能原因包括电击产生的临时膜孔径太小和大 DNA 扩散速度慢等, 因此电转技术多用于 EVs 的 siRNA 或 miRNA 包载^[156]。电转的效率可能跟囊泡的来源有关, 因此不同来源的囊泡电转条件需要摸索优化^[157]。电转可能导致 RNA 和 EVs 聚集, 从而降低 EVs 的负载能力^[158]; 在电转缓冲液加入膜稳定剂如海藻糖 (trehalose), 可以降低电转引起的 EVs 集聚^[159-160]。电转技术不仅可以用于囊泡的核酸包载, 也可用于小分子的包载^[161]。小分子包载效率与囊泡数量、小分子浓度有关, 比如囊泡的数量和 DOX 的浓度均与 DOX 囊泡的包载率呈正相关^[162]。

化学转染是直接货物包载入 EVs 的常用方法。脂质体转染是一种重复性好、简便有效的货物装载方法^[163]; 但脂质体转染也存在转染效率低的缺点^[164]。脂质体常用于将核酸包载至 EVs^[165], 比如, 通过脂质体转染, 加载有 miR-184 的甘蓝囊泡能有效抑制肿瘤的生长^[154]。CaCl₂ 与 DNA 等核酸结合, 可促进核酸与细胞质膜结合; 热激 (heat shock) 通过改变膜流动性, 促进核酸进入细胞。有研究结合 CaCl₂ 转染和热激将核酸分子包载到囊泡中, 例如将 miR-15a 与 0.1 mol·L⁻¹ CaCl₂ 冰上孵育 30 min, 42 °C 热激 60 s, 然后再于冰上孵育 5 min 可以将 miR-15a 高效地包载到 EVs^[166]。

超声处理可将 PTX 等小分子和蛋白质等多种分子包载到 EVs 中。大麻二醇通过超声可以包载入人脐带间充质干细胞产生的 EVs 中, 这种囊泡可以抑制三阴性乳腺癌 MDA-MB-231 细胞移植瘤的生长^[167]。RAW264.7 细胞产生的 EVs 通过超声可以有效地包载过氧化氢酶 (catalase), 包载效率要高

于共孵育法和冻融法, 与挤压法相当^[168]。研究发现, 超声处理的 EVs 粒径、膜完整性和细胞内吞均受影响^[169]。RAW264.7 细胞来源的 EVs 在经超声包载 PTX 之后粒径变大、zeta 电位升高, 包载效率要高于电转和共孵育法^[169]。然而, 也有研究未见超声对囊泡性状的改变, 例如人源脂肪组织干细胞分泌的 EVs 通过超声能够有效包载小分子酪氨酸激酶抑制剂, 包载效率比共孵育法高 4 倍, 且不会引起囊泡聚集^[170]。这些差异可能跟所用的囊泡来源不同有关。

3.2 细胞外囊泡膜表面工程化改造

EVs 是一种脂膜结构, 膜上嵌入了不同的蛋白质, 囊泡表面也以糖脂、糖蛋白质等糖复合物的形式表达不同的糖链, 故可通过遗传学操作以及生物偶联技术将荧光探针、靶向肽及药物分子、纳米抗体和适配体等生物活性分子与脂质、蛋白质和糖链偶联并表达在 EVs 膜表面^[171]。EVs 膜工程化改造包括基于亲代细胞遗传修饰、代谢工程的 EVs 膜表面分子展示及基于物理化学技术的 EVs 膜表面分子展示。

3.2.1 基于亲代细胞的细胞外囊泡膜表面分子展示

EVs 表面加入靶向肽等功能性分子可以增强囊泡的靶向性, 常见的办法是将靶向性分子替换 EVs 表面高丰度的跨膜蛋白的胞外区表达融合蛋白。溶酶体相关膜蛋白 2b (lysosome associated membrane protein 2b, Lamp2b) 和四次跨膜蛋白家族成员 CD9、CD63、CD81 是常见的 EVs 膜蛋白, 这些分子的胞内区常用做构建融合蛋白的骨架。表皮生长因子受体 (epidermal growth factor receptor, EGFR)、人表皮生长因子受体 2 (human epidermal growth factor receptor 2, HER2)、血小板衍生生长因子受体 (platelet-derived growth factor receptor, PDGFR) 等肿瘤细胞高表达的受体酪氨酸激酶的配体是常用的构建具有肿瘤靶向融合蛋白的分子。利用源性树突细胞表达序列为 YTIWMPENPRPGTPCDIFTNSRGKRASNG 的脑靶向肽 RVG (rabies viral glycoprotein) 与 Lamp2b 的融合蛋白 Lamp2b-RVG, 序列为 ASSLNIA 的肌肉组织靶向肽 (muscle specific peptide, MSP) 与 Lamp2b 的融合蛋白 Lamp2b-MSP, 生成分别表达 Lamp2b-RVG 和 Lamp2b-MSP 的囊泡, 这些囊泡可以分别特

异性地进入神经细胞 Neuro2A 和肌肉细胞 C2C12, 这些囊泡载入 siRNA 后, 可以有效地敲低受体细胞中的靶基因表达; 通过电转载入 GAPDH 的 siRNA 后, Lamp2b-RVG 囊泡可以在多个脑区敲低 GAPDH 的表达, 但未见 Lamp2b-MSP 囊泡在肌肉组织的蓄积^[172]。EGFR 是一种在肿瘤细胞表面高表达的跨膜糖蛋白^[173-174]。通过对供体 HEK293 细胞进行遗传操作, 将能与 EGFR 结合的 GE11 肽 (YHWYGYTPQNVI) 与 PDGFR 跨膜区以融合蛋白形式表达在囊泡表面, 可靶向 EGFR 高表达的乳腺癌细胞^[165]。糖基化是一种广泛的蛋白质翻译后修饰方式, 在 Lamp2b- 靶向肽融合蛋白上多处引入糖基化位点, 以防止肽的降解和增加融合蛋白在细胞与囊泡的表达, 由此所得的囊泡对神经母细胞瘤细胞的靶向能力增强^[175]。乳糖黏蛋白 (lactadherin) 的 C1C2 结构域能够与磷脂酰丝氨酸特异性结合, 靶向肽等功能性分子也常通过与 C1C2 结构域融合形成融合蛋白以实现在囊泡表面的表达^[176]。衰变加速因子 (decay accelerating factor) 来源的磷脂酰肌醇锚定信号肽与 EGFR 的抗体 EGa1 或 R2 结合, 也可以将抗体展示在囊泡膜表面^[177]。改造细菌囊泡膜整合蛋白毒素, 将具有肿瘤靶向性的抗体、配体 (ligand) 或亲合体 (affibody) 替换毒素的胞外区, 也可以将靶向性的多肽比如整合素 $\alpha_v\beta_3$ 靶向肽 RGD 等偶联至囊泡表面, 从而实现囊泡的肿瘤靶向^[178]。溶细胞素 A 是大肠埃希菌囊泡表面含量最高的毒力蛋白, 是常用于构建肿瘤靶向融合分子的靶蛋白。HER2 的亲合体^[179] 和表皮生长因子 (epidermal growth factor, EGF)^[180] 均可用于和溶细胞素 A 构建融合蛋白, 实现细菌囊泡的肿瘤靶向。

尽管靶向肽等功能性分子借助膜融合蛋白技术成功实现了在 EVs 膜表面的展示, 但这一方法仍需改进以克服如下不足: 1) 复杂、耗时, 通常较难操作; 2) 融合蛋白可能会在 EVs 生成与分泌过程中降解, 而不是分选到 EVs 中, 并且重组蛋白与 EVs 膜蛋白的融合可能损害这些膜蛋白的功能; 3) 靶向配体容易降解; 4) 大多数干细胞和原代细胞并不适合基因工程方法, 因为它们通常难以进行转染。

不适合遗传修饰展示的分子可以通过代谢标

记的方式实现展示。代谢标记通常是将特定的标签分子通过细胞代谢整合到 EVs 的表面, 这些分子包括脂质、氨基酸和糖类物质等。目前, 脂质的代谢标记主要基于磷酸脂。叠氮修饰的胆碱通过脂质合成途径可生成叠氮化的磷酸酰胆碱, 而磷脂 (包括磷脂酰胆碱) 是细胞质膜和 EVs 膜的主要成分, 因而可以整合到 EVs 膜上; 通过生物正交反应 (bioorthogonal reaction) 可以将靶向分子或货物展示在膜上^[181]。氨基酸的代谢标记主要通过膜蛋白中引入可以进行生物正交反应的非天然氨基酸, 例如在间充质干细胞中 6-叠氮-L-去甲亮氨酸可以通过甲酰 tRNA 合成酶 L274G 突变体 (methionyl tRNA synthetase, MetRS^{L274G}) 整合入膜蛋白质, L-叠氮高丙氨酸也可整合入膜蛋白质^[182]。单糖的代谢标记主要利用唾液酸生物合成途径在细胞膜表面末端唾液酸中加入生物正交反应基团, 用于连接靶向性配体或治疗性药物等分子, 叠氮修饰的全乙酰基甘露糖胺是常用的代谢标记底物^[183]。例如, 经代谢标记整合到 EVs 膜表面的末端唾液酸, 通过其带有的叠氮, 可与 PEG 化的透明质酸发生反应, 这一修饰可以增强所得囊泡对 CD44 高表达的风湿性关节炎组织的主动靶向能力^[184]。这些策略同样适用构建靶向肿瘤的囊泡。

3.2.2 基于物理化学技术的细胞外囊泡膜表面分子展示 生物正交反应是细胞和 EVs 表面修饰的常用化学方法^[185-186]。生物正交反应一般均是具有反应高效、选择性好和反应模块化特点的点击化学 (click chemistry) 反应。铜催化的叠氮炔环加成和张力催化的叠氮炔环加成是在 EVs 表面进行生物偶联的常用点击化学方法。铜催化的叠氮炔环加成是点击化学的一个代表性反应, 该反应耗时短、特异性高, 并且在水溶性缓冲液中有较好的相容性。该法修饰对囊泡的结构与功能影响小, 例如不改变囊泡的大小, 不影响囊泡与受体细胞的结合^[186]。但铜离子往往容易对 EVs 造成损害, 因此, 张力催化的叠氮炔环加成比铜催化的叠氮炔环加成更多地被用于将 EVs 与靶向肽进行偶联^[187]。氨基和巯基借助酰胺化等生物正交偶联反应也可将荧光探针、同位素造影剂和靶向肽修饰到 EVs 膜表面^[39]。除了生物正交反

应, 酶促反应也用于将 EVs 表面分子与靶向肽等目标分子通过共价键连接。有研究利用转肽酶 Sortase A 和蛋白连接酶 OaAEP1, 可将 EGFR 靶向肽和 EGFR 纳米抗体以共价键形式偶联到 EVs 上, 无需对供体细胞进行任何遗传修饰^[188]。

靶向性配体等功能性分子也可以利用疏水性分子通过相似相溶的原理, 嵌入 EVs 脂质双层结构, 锚定在 EVs 膜表面。例如, 将 EGFR 的纳米抗体 R2 或 EGa1 和 PEG 分别与磷脂缀合, 形成的复合物可以通过磷脂锚定在 EVs 膜表面, 这一修饰不影响囊泡形态、粒径分布和囊泡蛋白质组成, 但可以增强 EVs 对 EGFR 高表达的肿瘤细胞的靶向性, 同时延长囊泡在血液中的循环时间^[189]。不对称 siRNA (hydrophobically modified siRNA, hsiRNAs) 在经过胆固醇等疏水性脂质修饰后, 可以通过脂质锚定在囊泡表面, 或通过脂质介导的融合进入囊泡, siRNA 的包载效率主要同脂质与 siRNA 的连接方式和所用连接子类型有关^[190]。siRNA 的疏水性决定了 siRNA-EVs 复合物的负载效率和沉默活性^[191], 这种修饰不影响囊泡的大小和完整性^[192]。为克服囊泡表面遗传修饰的缺陷和不足, 研究人员设计了一种称作 DNA 拴缆的分子, 将拴缆 DNA 与胆固醇连接形成 DNA 拴缆-胆固醇分子, 在室温下与囊泡涡旋 5 min, 即可通过胆固醇将拴缆 DNA 锚定在囊泡表面; 通过与 DNA 拴缆互补配对的 DNA, 可以将荧光分子、活性分子和靶向分子展示在囊泡表面^[193]。

3.3 货物包载策略与细胞外囊泡膜表面分子展示技术联用

为同时增强 EVs 的靶向性和减毒增效, 多数研究倾向于将货物包载和 EVs 膜表面分子展示结合在一起。

通过蔗糖梯度分离所得食用生姜 30% 蔗糖级分囊泡和 45% 蔗糖级分囊泡中的脂质 47% 为磷脂酸, 15% 为双半乳糖二酰甘油, 27% 为单半乳糖二酰甘油。提取分离这些生姜囊泡脂质, 采用装备 200 nm 聚碳酸酯膜的脂质体挤压仪制备空载的合成囊泡, 所得的合成囊泡能够有效包载 DOX, 而且能够通过吞噬作用被细胞摄取, 囊泡经由叶酸 (folic acid, FA) 修饰后可被结肠癌细胞 CT-26 高效地摄取, 在体内主动特异性靶向 CT-26 移植瘤并有效地抑制肿

瘤生长; FA 纳米载体在酸性环境下可更加快速地将这种药物, 从而降低 DOX 的严重副作用^[194]。将与 P-选择素具有高亲和力的岩藻依聚糖作为外涂层; 生物相容性好的阳离子聚合物 ϵ -多聚赖氨酸 (ϵ -poly-lysine, ϵ -PLL) 作为中间层; 包裹载有 DOX 的生姜衍生脂质载体, 成功构建了叠层生姜衍生脂质载体 (layer-by-layer ginger lipid vectors, LbL-GDLV), 这使得 LbL-GDLV 通过与肿瘤细胞 P-选择素结合实现肿瘤的主动靶向; 在 Luc-HT-29 和 HCT-116 异种移植瘤模型中, 负载 DOX 的 LbL-GDLVs 可显著抑制肿瘤生长, 显示出比游离 DOX 更好的治疗效果; 更重要的是, LbL-GDLVs 具有良好的生物相容性, 显著减轻了游离 DOX 的心脏毒性, 避免了结肠肿瘤细胞对游离 DOX 的耐药性^[195]。为了增强生姜源囊泡 (ginger derived exosome like nanovesicles, GDENs) 与 KB 口腔肿瘤细胞的结合, 将尾部接有胆固醇和头部接有 FA 的三路结 (three way junction, 3WJ) 结构域的 proHead RNA 分子通过胆固醇插入囊泡表面; 包载生存素 (survivin) siRNA 后形成的 FA-3WJ/GDEN/siRNA 囊泡能够有效敲低细胞中生存素的表达, 效果与脂质体转染相当; 静脉给药后该囊泡还能在体内有效抑制人源口腔表皮癌细胞 KB 裸鼠移植瘤的生长^[196]。

葡萄柚囊泡衍生脂质制成的纳米载体 (grapefruit-derived nanovectors, GNVs) 可有效地递送不同物质, 包括信号转导与激活因子 3 (signal transducer and activator of transcription 3, STAT3) 小分子抑制剂 JSI-124、PTX 等化疗药物、生物素化增强型黄色荧光蛋白 (enhanced yellow fluorescent protein, eYFP) 的 DNA 表达载体、荧光素酶的 DNA 表达载体、荧光素酶 siRNA 和生物素化蛋白质 (如生物素化的 CD4 抗体或 CD8 抗体)。装载 JSI-124 的 GNVs 可以显著抑制 STAT3 的激活, 有效抑制小鼠胶质瘤细胞 GL26 的移植瘤生长, 并且显著延长小鼠的存活时间^[197]。GNVs 经 FA 修饰可实现对肿瘤的主动靶向, 在小鼠结肠癌细胞 CT26 移植瘤模型和人结肠癌细胞 SW620 的 SCID 小鼠移植瘤模型中, GNVs-FA 在肿瘤组织中的分布分别比 GNVs 多 1 300 倍和 1 600 倍^[197]。通过肝素

的羧基结合靶向胶质瘤 $\alpha_v\beta_3$ 的 cRGD 肽, 载入己二酸二胍-阿霉素构建肝素纳米粒子 (doxorubicin nanoparticles, DNs), 再将葡萄柚 EVs 通过葡萄柚 EVs 表面高丰度的磷脂酰乙醇胺, 和肝素纳米粒上的肝素自由羧基反应, 制备酸敏感的仿生阿霉素胶质瘤靶向囊泡 (EV-DNs); 所得囊泡能够通过受体介导的转胞吞作用和膜融合穿越血脑屏障, 并深层次穿透到脑肿瘤组织内部, 显著增强药物在脑肿瘤部位的富集, 抑制肿瘤的生长, 提升原位脑胶质瘤小鼠的生存期^[198]。

细菌囊泡用于肿瘤靶向治疗, 通常需要做两方面的处理: 一是减毒, 二是囊泡表面修饰以提高囊泡对肿瘤细胞和组织的靶向性。去除细菌囊泡表面的毒素有很多方法, 遗传学改造是广泛应用的一种。例如大肠埃希菌 K-12 W3110 *E. coli* 的毒性主要与 LPS 中脂质 A (lipid A) 有关, 可以通过敲除其中脂质 A 合成酶基因 *msbB*, 减低其产生的囊泡的毒性^[179]。因此, *Δ msbB* K-12 W3110 *E. coli* 菌株广泛被用于制备工程化的细菌囊泡。除了 *Δ msbB* K-12 W3110 *E. coli* 菌株, 鸟苷 5'-二磷酸-3'-二磷酸合成缺陷的鼠伤寒沙门菌等其他减毒细菌也被用于生产药物递送的细菌囊泡^[199]。细菌囊泡减毒也可以通过使用溶菌酶降解囊泡表面的内毒素, 或采用内毒素去除试剂盒去除内毒素; 表达人 TRAIL 片段 (氨基酸序列 114~281) 的大肠埃希菌囊泡采用溶菌酶去除内毒素, 然后在膜表面通过棕榈酸接上 $\alpha_v\beta_3$ 整合素靶向配体 RGD (G) 或 RGP (P), 并将光敏剂 (photosensitizer) 吡啶菁绿 (indocyanine green, ICG), 通过融合效应及 ICG 与 RGD 或 RGP 的电荷相互作用, 加载到不同囊泡表面, 分别形成 ICG-RGD-OMVs (I-G-OMVs) 和 ICG-RGP-OMVs (I-P-OMVs), 同时制备 ICG-OMVs; 在近红外光的刺激下, I-P-OMVs 能诱导针对 B16F10 黑色素瘤细胞 C57BL/6 小鼠移植瘤的光热光动力学反应, 引起播散性的肿瘤细胞凋亡^[178]。

4 结语与展望

哺乳动物 EVs、细菌 EVs 和植物 EVs 均已被证实具有抗肿瘤作用且可作为抗肿瘤药物递送载体,

而且作用机制多样, 几乎可以调节所有的肿瘤特征性功能^[200]。EVs 在临床中的应用受到了广泛的关注, 但是 EVs 作为一种新型治疗手段, 还有许多问题亟待解决: 1) 药物质量的稳定可控是药物安全性和有效性的保证, 目前尚无 EVs 大量生产方法, 仍缺乏确定的特征性标志物。目前迫切需要将 EVs 分离纯化的流程和药效评价的流程标准化, 使得不同实验室的结果、同一实验室不同批次结果具有可比性。2) EVs 生成、内含物装载、转运与摄取和内含物在靶细胞的释放机制等仍处于探索期, 这些机制研究的进展可以帮助制备安全性更好、疗效更显著、毒副作用更小的 EVs 诊疗药物。3) 因多数植物和细菌的基因组序列未知, 极大地限制了基于鸟枪法

(Shotgun) 的蛋白质组学技术在植物囊泡和细菌囊泡蛋白质内含物鉴定方面的应用, 进而阻碍这些囊泡作用的物质基础和作用机制研究, 也阻滞了这些囊泡蛋白质类特征标志物的发现和鉴定, 所以需要发展新的特别是从头测序的蛋白质组学技术用于这些囊泡蛋白质的鉴定。4) EVs 的长期安全性和有效性仍需更多的试验进行评价。目前虽然有超过 300 项的临床试验在评价 EVs 的各种治疗作用, 但是尚无基于 EVs 的治疗药物被各国药物监管机构批准用于临床实践, 未来需要更多的研究去评价 EVs 对肿瘤等疾病的治疗效果和安全性, 为 EVs 诊疗药物的临床应用铺平道路。

[参考文献]

- [1] van Niel G, Carter D R F, Clayton A, *et al.* Challenges and directions in studying cell-cell communication by extracellular vesicles[J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2022. DOI: 10.1038/s41580-022-00460-3.
- [2] Raposo G, Stahl P D. Extracellular vesicles: a new communication paradigm?[J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2019, 20(9): 509–510.
- [3] Cheng L, Hill A F. Therapeutically harnessing extracellular vesicles[J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2022. DOI: 10.1038/s41573-022-00410-w.
- [4] Herrmann I K, Wood M J A, Fuhrmann G. Extracellular vesicles as a next-generation drug delivery platform[J]. *Nat Nanotechnol*, 2021, 16(7): 748–759.
- [5] Hoshino A, Kim H S, Bojmar L, *et al.* Extracellular vesicle and particle biomarkers define multiple human cancers[J]. *Cell*, 2020, 182(4): 1044–1061.e1018.
- [6] Lebleu V S, Kalluri R. Exosomes as a multicomponent biomarker platform in cancer[J]. *Trends Cancer*, 2020, 6(9): 767–774.
- [7] Pegtel D M, Gould S J. Exosomes[J]. *Annu Rev Biochem*, 2019, 88: 487–514. DOI: 10.1146/annurev-biochem-013118-111902.
- [8] van Deun J, Mestdagh P, Agostinis P, *et al.* EV-TRACK: transparent reporting and centralizing knowledge in extracellular vesicle research[J]. *Nat Methods*, 2017, 14(3): 228–232.
- [9] Nieuwland R, Falcón-Pérez J M, Théry C, *et al.* Rigor and standardization of extracellular vesicle research: paving the road towards robustness[J]. *J Extracell Vesicles*, 2020, 10(2): e12037. DOI: 10.11002/jev2.12037.
- [10] Xu R, Rai A, Chen M, *et al.* Extracellular vesicles in cancer — implications for future improvements in cancer care[J]. *Nat Rev Clin Oncol*, 2018, 15(10): 617–638.
- [11] Shurtleff M J, Temoche-Diaz M, Schekman R. Extracellular vesicles and cancer: caveat lector[J]. *Ann Rev Cancer Biol*, 2018, 2(1): 395–411.
- [12] Cong M, Tan S, Li S, *et al.* Technology insight: plant-derived vesicles—how far from the clinical biotherapeutics and therapeutic drug carriers?[J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2022, 182: 114108. DOI: 10.1016/j.addr.2021.114108.
- [13] Dad H A, Gu T W, Zhu A Q, *et al.* Plant exosome-like nanovesicles: emerging therapeutics and drug delivery nanoplatforms[J]. *Mol Ther*, 2021, 29(1): 13–31.
- [14] van Niel G, D'Angelo G, Raposo G. Shedding light on the cell biology of extracellular vesicles[J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2018, 19(4): 213–228.
- [15] Chargaff E, West R. The biological significance of the thromboplastic protein of blood[J]. *J Biol Chem*, 1946, 166(1): 189–197.
- [16] Wolf P. The nature and significance of platelet products in human plasma[J]. *Br J Haematol*, 1967, 13(3): 269–288.
- [17] Mathieu M, Martin-Jaular L, Lavie G, *et al.* Specificities of secretion and uptake of exosomes and other extracellular vesicles for cell-to-cell communication[J]. *Nat Cell Biol*, 2019, 21(1): 9–17.
- [18] Trams E G, Lauter C J, Salem N Jr, *et al.* Exfoliation of membrane ecto-enzymes in the form of micro-vesicles[J]. *Biochim Biophys Acta*, 1981, 645(1): 63–70.
- [19] Atkin-Smith G K, Poon I K H. Disassembly of the dying: mechanisms and functions[J]. *Trends Cell Biol*, 2017, 27(2): 151–162.
- [20] Shen B, Wu N, Yang J M, *et al.* Protein targeting to exosomes/microvesicles by plasma membrane anchors[J]. *J Biol Chem*, 2011,

- 286(16): 14383–14395.
- [21] Théry C, Witwer K W, 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]. *J Extracell Vesicles*, 2018, 7(1): 1535750. DOI: 10.1080/20013078.2018.1535750.
- [22] Couch Y, Buzás E I, Vizio D D, *et al.* A brief history of nearly EV-everything—the rise and rise of extracellular vesicles[J]. *J Extracell Vesicles*, 2021, 10(14): e12144. DOI: 10.1002/jev2.12144.
- [23] Théry C, Amigorena S, Raposo G, *et al.* Isolation and characterization of exosomes from cell culture supernatants and biological fluids[J]. *Curr Protoc Cell Biol*, 2006, Chapter 3: Unit 3.22. DOI: 10.1002/0471143030.cb0322s30.
- [24] Jong A Y, Wu C H, Li J, *et al.* Large-scale isolation and cytotoxicity of extracellular vesicles derived from activated human natural killer cells[J]. *J Extracell Vesicles*, 2017, 6(1): 1294368. DOI: 10.1080/20013078.2017.1294368.
- [25] Busatto S, Vilanilam G, Ticer T, *et al.* Tangential flow filtration for highly efficient concentration of extracellular vesicles from large volumes of fluid[J]. *Cells*, 2018, 7(12): 273. DOI: 10.3390/cells7120273.
- [26] Sitar S, Kejžar A, Pahovnik D, *et al.* Size characterization and quantification of exosomes by asymmetrical-flow field-flow fractionation[J]. *Anal Chem*, 2015, 87(18): 9225–9233.
- [27] Böing A N, van der Pol E, Grootemaat A E, *et al.* Single-step isolation of extracellular vesicles by size-exclusion chromatography[J]. *J Extracell Vesicles*, 2014, 3(1): 1–11.
- [28] Mathivanan S, Lim J W E, Tauro B J, *et al.* Proteomics analysis of A33 immunoaffinity-purified exosomes released from the human colon tumor cell line LIM1215 reveals a tissue-specific protein signature[J]. *Mol Cell Proteomics*, 2010, 9(2): 197–208.
- [29] Takov K, Yellon D M, Davidson S M. Comparison of small extracellular vesicles isolated from plasma by ultracentrifugation or size-exclusion chromatography: yield, purity and functional potential[J]. *J Extracell Vesicles*, 2019, 8(1): 1560809. DOI: 10.1080/20013078.2018.1560809.
- [30] Roux Q, van Deun J, Dedeyne S, *et al.* The EV-TRACK summary add-on: integration of experimental information in databases to ensure comprehensive interpretation of biological knowledge on extracellular vesicles[J]. *J Extracell Vesicles*, 2020, 9(1): 1699367. DOI: 10.1080/20013078.2019.1699367.
- [31] Verweij F J, Balaj L, Boulanger C M, *et al.* The power of imaging to understand extracellular vesicle biology *in vivo*[J]. *Nat Methods*, 2021, 18(9): 1013–1026.
- [32] Tian T, Zhu Y L, Zhou Y Y, *et al.* Exosome uptake through clathrin-mediated endocytosis and macropinocytosis and mediating miR-21 delivery[J]. *J Biol Chem*, 2014, 289(32): 22258–22267.
- [33] Valapala M, Vishwanatha J K. Lipid raft endocytosis and exosomal transport facilitate extracellular trafficking of annexin A2[J]. *J Biol Chem*, 2011, 286(35): 30911–30925.
- [34] Feng D, Zhao W L, Ye Y Y, *et al.* Cellular internalization of exosomes occurs through phagocytosis[J]. *Traffic*, 2010, 11(5): 675–687.
- [35] Escrevente C, Keller S, Altevogt P, *et al.* Interaction and uptake of exosomes by ovarian cancer cells[J]. *BMC Cancer*, 2011, 11: 108. DOI: 10.1186/1471-2407-11-108.
- [36] del Conde I, Shrimpton C N, Thiagarajan P, *et al.* Tissue-factor-bearing microvesicles arise from lipid rafts and fuse with activated platelets to initiate coagulation[J]. *Blood*, 2005, 106(5): 1604–1611.
- [37] Rennick J J, Johnston A P R, Parton R G. Key principles and methods for studying the endocytosis of biological and nanoparticle therapeutics[J]. *Nat Nanotechnol*, 2021, 16(3): 266–276.
- [38] Christianson H C, Svensson K J, van Kuppevelt T H, *et al.* Cancer cell exosomes depend on cell-surface heparan sulfate proteoglycans for their internalization and functional activity[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2013, 110(43): 17380–17385.
- [39] Saunderson S C, Dunn A C, Crocker P R, *et al.* CD169 mediates the capture of exosomes in spleen and lymph node[J]. *Blood*, 2014, 123(2): 208–216.
- [40] Joshi B S, de Beer M A, Giepmans B N G, *et al.* Endocytosis of extracellular vesicles and release of their cargo from endosomes[J]. *ACS Nano*, 2020, 14(4): 4444–4455.
- [41] Parolini I, Federici C, Raggi C, *et al.* Microenvironmental pH is a key factor for exosome traffic in tumor cells[J]. *J Biol Chem*, 2009, 284(49): 34211–34222.
- [42] 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.
- [43] Santos M F, Rappa G, Karbanová J, *et al.* VAMP-associated protein-A and oxysterol-binding protein-related protein 3 promote the entry of late endosomes into the nucleoplasmic reticulum[J]. *J Biol Chem*, 2018, 293(36): 13834–13848.
- [44] Santos M F, Rappa G, Karbanová J, *et al.* Itraconazole inhibits nuclear delivery of extracellular vesicle cargo by disrupting the entry of late endosomes into the nucleoplasmic reticulum[J]. *J Extracell Vesicles*, 2021, 10(10): e12132. DOI: 10.1002/jev2.12132.
- [45] Lai C P, Mardini O, Ericsson M, *et al.* Dynamic biodistribution of extracellular vesicles *in vivo* using a multimodal imaging reporter[J].

- ACS Nano*, 2014, 8(1): 483–494.
- [46] Smyth T, Kullberg M, Malik N, *et al.* Biodistribution and delivery efficiency of unmodified tumor-derived exosomes[J]. *J Control Release*, 2015, 199: 145–155. DOI: 10.1016/j.jconrel.2014.12.013.
- [47] Verweij F J, Revenu C, Arras G, *et al.* Live tracking of inter-organ communication by endogenous exosomes *in vivo*[J]. *Dev Cell*, 2019, 48(4): 573–589.e574.
- [48] Hyenne V, Ghoroghi S, Collot M, *et al.* Studying the fate of tumor extracellular vesicles at high spatiotemporal resolution using the zebrafish embryo[J]. *Dev Cell*, 2019, 48(4): 554–572.e557.
- [49] 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.
- [50] 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. DOI: 10.1016/j.jare.2021.01.001.
- [51] Koh E, Lee E J, Nam G H, *et al.* Exosome-SIRP α , a CD47 blockade increases cancer cell phagocytosis[J]. *Biomaterials*, 2017, 121: 121–129. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2017.01.004.
- [52] Hanahan D. Hallmarks of cancer: new dimensions[J]. *Cancer Discov*, 2022, 12(1): 31–46.
- [53] Hanahan D, Weinberg R A. Hallmarks of cancer: the next generation[J]. *Cell*, 2011, 144(5): 646–674.
- [54] Valadi H, Ekström 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.
- [55] Pegtel D M, Cosmopoulos K, Thorley-Lawson D A, *et al.* Functional delivery of viral miRNAs via exosomes[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2010, 107(14): 6328–6333.
- [56] Zhang Y, Liu D, Chen X, *et al.* Secreted monocytic miR-150 enhances targeted endothelial cell migration[J]. *Mol Cell*, 2010, 39(1): 133–144.
- [57] Al-Nedawi K, Meehan B, Micallef J, *et al.* Intercellular transfer of the oncogenic receptor EGFRvIII by microvesicles derived from tumour cells[J]. *Nat Cell Biol*, 2008, 10(5): 619–624.
- [58] Skog J, Würdinger T, van Rijn S, *et al.* Glioblastoma microvesicles transport RNA and proteins that promote tumour growth and provide diagnostic biomarkers[J]. *Nat Cell Biol*, 2008, 10(12): 1470–1476.
- [59] Gross J C, Chaudhary V, Bartscherer K, *et al.* Active Wnt proteins are secreted on exosomes[J]. *Nat Cell Biol*, 2012, 14(10): 1036–1045.
- [60] Zomer A, Maynard C, Verweij F J, *et al.* *In vivo* imaging reveals extracellular vesicle-mediated phenocopying of metastatic behavior[J]. *Cell*, 2015, 161(5): 1046–1057.
- [61] Melo S A, Luecke L B, Kahlert C, *et al.* Glypican-1 identifies cancer exosomes and detects early pancreatic cancer[J]. *Nature*, 2015, 523(7559): 177–182.
- [62] Möller A, Lobb R J. The evolving translational potential of small extracellular vesicles in cancer[J]. *Nat Rev Cancer*, 2020, 20(12): 697–709.
- [63] Poggio M, Hu T, Pai C C, *et al.* Suppression of exosomal PD-L1 induces systemic anti-tumor immunity and memory[J]. *Cell*, 2019, 177(2): 414–427.e413.
- [64] Chen G, Huang A C, Zhang W, *et al.* Exosomal PD-L1 contributes to immunosuppression and is associated with anti-PD-1 response[J]. *Nature*, 2018, 560(7718): 382–386.
- [65] Peinado H, Alečković M, Lavotshkin S, *et al.* Melanoma exosomes educate bone marrow progenitor cells toward a pro-metastatic phenotype through MET[J]. *Nat Med*, 2012, 18(6): 883–891.
- [66] Garcia-Silva S, Benito-Martín A, Nogués L, *et al.* Melanoma-derived small extracellular vesicles induce lymphangiogenesis and metastasis through an NGFR-dependent mechanism[J]. *Nat Cancer*, 2021, 2(12): 1387–1405.
- [67] Zhou W, Fong M Y, Min Y, *et al.* Cancer-secreted miR-105 destroys vascular endothelial barriers to promote metastasis[J]. *Cancer cell*, 2014, 25(4): 501–515.
- [68] Rodrigues G, Hoshino A, Kenific C M, *et al.* Tumour exosomal CEMIP protein promotes cancer cell colonization in brain metastasis[J]. *Nat Cell Biol*, 2019, 21(11): 1403–1412.
- [69] Costa-Silva B, Aiello N M, Ocean A J, *et al.* Pancreatic cancer exosomes initiate pre-metastatic niche formation in the liver[J]. *Nat Cell Biol*, 2015, 17(6): 816–826.
- [70] Keklikoglou I, Cianciaruso C, Güç E, *et al.* Chemotherapy elicits pro-metastatic extracellular vesicles in breast cancer models[J]. *Nat Cell Biol*, 2019, 21(2): 190–202.
- [71] Hoshino A, Costa-Silva B, Shen T L, *et al.* Tumour exosome integrins determine organotropic metastasis[J]. *Nature*, 2015, 527(7578): 329–335.
- [72] Matsumura Y, Maeda H. A new concept for macromolecular therapeutics in cancer chemotherapy: mechanism of tumor-tropic accumulation of proteins and the antitumor agent smancs[J]. *Cancer Res*, 1986, 46(12 Pt 1): 6387–6392.
- [73] Galindo-Hernandez O, Villegas-Comonfort S, Candanedo F, *et al.* Elevated concentration of microvesicles isolated from peripheral blood in breast cancer patients[J]. *Arch Med Res*, 2013, 44(3): 208–214.
- [74] Baran J, Baj-Krzyworzeka M, Weglarczyk K, *et al.* Circulating tumour-derived microvesicles in plasma of gastric cancer patients[J]. *Cancer Immunol Immunother*, 2010, 59(6): 841–850.
- [75] Logozzi M, de Milito A, Lugini L, *et al.* High levels of exosomes expressing CD63 and caveolin-1 in plasma of melanoma patients[J].

- PLoS One*, 2009, 4(4): e5219. DOI: 10.1371/journal.pone.0005219.
- [76] Kosaka N, Yoshioka Y, Fujita Y, *et al.* Versatile roles of extracellular vesicles in cancer[J]. *J Clin Invest*, 2016, 126(4): 1163–1172.
- [77] Raposo G, Nijman H W, Stoorvogel W, *et al.* B lymphocytes secrete antigen-presenting vesicles[J]. *J Exp Med*, 1996, 183(3): 1161–1172.
- [78] 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.
- [79] Tian Y, Li S, Song J, *et al.* A doxorubicin delivery platform using engineered natural membrane vesicle exosomes for targeted tumor therapy[J]. *Biomaterials*, 2014, 35(7): 2383–2390.
- [80] Anguille S, Smits E L, Lion E, *et al.* Clinical use of dendritic cells for cancer therapy[J]. *Lancet Oncol*, 2014, 15(7): e257–e267. DOI: 10.1016/S1470-2045(13)70585-0.
- [81] Zhu L, Kalimuthu S, Gangadaran P, *et al.* Exosomes derived from natural killer cells exert therapeutic effect in melanoma[J]. *Theranostics*, 2017, 7(10): 2732–2745.
- [82] Zhang J, Ji C, Zhang H, *et al.* Engineered neutrophil-derived exosome-like vesicles for targeted cancer therapy[J]. *Sci Adv*, 2022, 8(2): eabj8207. DOI: 10.1126/sciadv.abj8207.
- [83] 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.
- [84] 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. DOI: 10.1172/jci.insight.99263.
- [85] Ricklefs F L, Alayo Q, Krenzlin H, *et al.* Immune evasion mediated by PD-L1 on glioblastoma-derived extracellular vesicles[J]. *Sci Adv*, 2018, 4(3): eaar2766. DOI: 10.1126/sciadv.aar2766.
- [86] Kim J W, Wieckowski E, Taylor D D, *et al.* Fas ligand-positive membranous vesicles isolated from sera of patients with oral cancer induce apoptosis of activated T lymphocytes[J]. *Clin Cancer Res*, 2005, 11(3): 1010–1020.
- [87] Albanese J, Meterissian S, Kontogianna M, *et al.* Biologically active fas antigen and its cognate ligand are expressed on plasma membrane-derived extracellular vesicles[J]. *Blood*, 1998, 91(10): 3862–3874.
- [88] Huber V, Fais S, Iero M, *et al.* Human colorectal cancer cells induce T-cell death through release of proapoptotic microvesicles: role in immune escape[J]. *Gastroenterology*, 2005, 128(7): 1796–1804.
- [89] Valenti R, Huber V, Filipazzi P, *et al.* Human tumor-released microvesicles promote the differentiation of myeloid cells with transforming growth factor- β -mediated suppressive activity on T lymphocytes[J]. *Cancer Res*, 2006, 66(18): 9290–9298.
- [90] Wolfers J, Lozier A, Raposo G, *et al.* Tumor-derived exosomes are a source of shared tumor rejection antigens for CTL cross-priming[J]. *Nat Med*, 2001, 7(3): 297–303.
- [91] Wang J, Cao Z, Wang P, *et al.* Apoptotic extracellular vesicles ameliorate multiple myeloma by restoring fas-mediated apoptosis[J]. *ACS Nano*, 2021, 15(9): 14360–14372.
- [92] Yuan Z, Kolluri K K, Gowers K H C, *et al.* TRAIL delivery by MSC-derived extracellular vesicles is an effective anticancer therapy[J]. *J Extracell Vesicles*, 2017, 6(1): 1265291. DOI: 10.1080/20013078.2017.1265291.
- [93] Rivoltini L, Chiodoni C, Squarcina P, *et al.* TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL)-armed exosomes deliver proapoptotic signals to tumor site[J]. *Clin Cancer Res*, 2016, 22(14): 3499–3512.
- [94] Dai S, Zhou X, Wang B, *et al.* Enhanced induction of dendritic cell maturation and HLA-A*0201-restricted CEA-specific CD8⁺ CTL response by exosomes derived from IL-18 gene-modified CEA-positive tumor cells[J]. *J Mol Med*, 2006, 84(12): 1067–1076.
- [95] Yang Y, Xiu F, Cai Z, *et al.* Increased induction of antitumor response by exosomes derived from interleukin-2 gene-modified tumor cells[J]. *J Cancer Res Clin Oncol*, 2007, 133(6): 389–399.
- [96] Tang K, Zhang Y, Zhang H, *et al.* Delivery of chemotherapeutic drugs in tumour cell-derived microparticles[J]. *Nat Commun*, 2012, 3(1): 1282. DOI: 10.1038/ncomms2282.
- [97] Guo M, Wu F, Hu G, *et al.* Autologous tumor cell-derived microparticle-based targeted chemotherapy in lung cancer patients with malignant pleural effusion[J]. *Sci Transl Med*, 2019, 11(474): eaat5690. DOI: 10.1126/scitranslmed.aat5690.
- [98] Ma J, Zhang Y, Tang K, *et al.* Reversing drug resistance of soft tumor-repopulating cells by tumor cell-derived chemotherapeutic microparticles[J]. *Cell Res*, 2016, 26(6): 713–727.
- [99] Bishop D G, Work E. An extracellular glycolipid produced by *Escherichia coli* grown under lysine-limiting conditions[J]. *Biochem J*, 1965, 96(2): 567–576.
- [100] Chatterjee S N, Das J. Electron microscopic observations on the excretion of cell-wall material by *Vibrio cholerae*[J]. *J Gen Appl Microbiol*, 1967, 49(1): 1–11.
- [101] Lee E Y, Choi D Y, Kim D K, *et al.* Gram-positive bacteria produce membrane vesicles: proteomics-based characterization of *Staphylococcus aureus*-derived membrane vesicles[J]. *Proteomics*, 2009, 9(24): 5425–5436.
- [102] Devoe I W, Gilchrist J E. Pili on meningococci from primary cultures of nasopharyngeal carriers and cerebrospinal fluid of patients with acute disease[J]. *J Exp Med*, 1975, 141(2): 297–305.
- [103] Toyofuku M, Nomura N, Eberl L. Types and origins of bacterial membrane vesicles[J]. *Nat Rev Microbiol*, 2019, 17(1): 13–24.

- [104] McMillan H M, Kuehn M J. The extracellular vesicle generation paradox: a bacterial point of view[J]. *EMBO J*, 2021, 40(21): e108174. DOI: 10.15252/embj.2021108174.
- [105] Hendrix A, de Wever O. Systemically circulating bacterial extracellular vesicles: origin, fate, and function[J]. *Trends Microbiol*, 2022, 30(3): 213–216.
- [106] Elhenawy W, Bording-Jorgensen M, Valguarnera E, et al. LPS remodeling triggers formation of outer membrane vesicles in salmonella[J]. *mBio*, 2016, 7(4): e00940-16. DOI: 10.1128/mBio.00940-16.
- [107] Dehinwal R, Cooley D, Rakov A V, et al. Increased production of outer membrane vesicles by salmonella interferes with complement-mediated innate immune attack[J]. *mBio*, 2021, 12(3): e0086921. DOI: 10.1128/mBio.00869-21.
- [108] Ojima Y, Sawabe T, Konami K, et al. Construction of hypervesiculation *Escherichia coli* strains and application for secretory protein production[J]. *Biotechnol Bioeng*, 2020, 117(3): 701–709.
- [109] Mashburn-Warren L M, Whiteley M. Special delivery: vesicle trafficking in prokaryotes[J]. *Mol Microbiol*, 2006, 61(4): 839-846.
- [110] Manabe T, Kato M, Ueno T, et al. Flagella proteins contribute to the production of outer membrane vesicles from *Escherichia coli* W3110[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2013, 441(1): 151–156.
- [111] Kulp A, Kuehn M J. Biological functions and biogenesis of secreted bacterial outer membrane vesicles[J]. *Annu Rev Microbiol*, 2010, 64: 163–184. DOI: 10.1146/annurev.micro.091208.073413.
- [112] Tulkens J, de Wever O, Hendrix A. Analyzing bacterial extracellular vesicles in human body fluids by orthogonal biophysical separation and biochemical characterization[J]. *Nat Protoc*, 2020, 15(1): 40–67.
- [113] Grochowska M, Perlejewski K, Laskus T, et al. The role of gut microbiota in gastrointestinal tract cancers[J]. *Arch Immunol Ther Exp(Warsz)*, 2022, 70(1): 7. DOI: 10.1007/s00005-021-00641-6.
- [114] Chronopoulos A, Kalluri R. Emerging role of bacterial extracellular vesicles in cancer[J]. *Oncogene*, 2020, 39(46): 6951–6960.
- [115] Sartorio M G, Pardue E J, Feldman M F, et al. Bacterial outer membrane vesicles: from discovery to applications[J]. *Annu Rev Microbiol*, 2021, 75(1): 609–630.
- [116] Kim O Y, Park H T, Dinh N T H, et al. Bacterial outer membrane vesicles suppress tumor by interferon- γ -mediated antitumor response[J]. *Nat Commun*, 2017, 8(1): 626. DOI: 10.1038/s41467-017-00729-8.
- [117] Park K S, Svennerholm K, Crescitelli R, et al. Synthetic bacterial vesicles combined with tumour extracellular vesicles as cancer immunotherapy[J]. *J Extracell Vesicles*, 2021, 10(9): e12120. DOI: 10.1002/jev2.12120.
- [118] Qing S, Lyu C, Zhu L, et al. Biomimetic bacterial outer membrane vesicles potentiate safe and efficient tumor microenvironment reprogramming for anticancer therapy[J]. *Adv Mater*, 2020, 32(47): e2002085. DOI: 10.1002/adma.202002085.
- [119] Shi Y, Meng L, Zhang C, et al. Extracellular vesicles of lactocaseibacillus paracasei PC-H1 induce colorectal cancer cells apoptosis via PDK1/AKT/Bcl-2 signaling pathway[J]. *Microbiol Res*, 2021, 255: 126921. DOI: 10.1016/j.micres.2021.126921.
- [120] An Q, van Bel A J, Hüchelhoven R. Do plant cells secrete exosomes derived from multivesicular bodies?[J]. *Plant Signal Behav*, 2007, 2(1): 4–7.
- [121] Cui Y, Gao J, He Y, et al. Plant extracellular vesicles[J]. *Protoplasma*, 2020, 257(1): 3–12.
- [122] Pinedo M, de la Canal L, de Marcos Lousa C. A call for rigor and standardization in plant extracellular vesicle research[J]. *J Extracell Vesicles*, 2021, 10(6): e12048. DOI: 10.1002/jev2.12048.
- [123] Rutter B D, Innes R W. Extracellular vesicles isolated from the leaf apoplast carry stress-response proteins[J]. *Plant Physiol*, 2017, 173(1): 728–741.
- [124] Zhang J, Qiu Y, Xu K. Characterization of GFP-AtPEN1 as a marker protein for extracellular vesicles isolated from *Nicotiana benthamiana* leaves[J]. *Plant Signal Behav*, 2020, 15(9): 1791519. DOI: 10.1080/15592324.2020.1791519.
- [125] Regente M, Pinedo M, San Clemente H, et al. Plant extracellular vesicles are incorporated by a fungal pathogen and inhibit its growth[J]. *J Exp Bot*, 2017, 68(20): 5485–5495.
- [126] Urzi O, Raimondo S, Alessandro R. Extracellular vesicles from plants: current knowledge and open questions[J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(10): 5366. DOI: 10.3390/ijms22105366.
- [127] He B, Hamby R, Jin H. Plant extracellular vesicles: trojan horses of cross-kingdom warfare[J]. *FASEB Bioadv*, 2021, 3(9): 657–664.
- [128] Cao M, Yan H, Han X, et al. Ginseng-derived nanoparticles alter macrophage polarization to inhibit melanoma growth[J]. *J Immunother Cancer*, 2019, 7(1): 326. DOI: 10.1186/s40425-019-0817-4.
- [129] Han X, Wei Q, Lv Y, et al. Ginseng-derived nanoparticles potentiate immune checkpoint antibody efficacy by reprogramming the cold tumor microenvironment[J]. *Mol Ther*, 2022, 30(1): 327–340.
- [130] Zhang L, He F, Gao L, et al. Engineering exosome-like nanovesicles derived from asparagus cochinchinensis can inhibit the proliferation of hepatocellular carcinoma cells with better safety profile[J]. *Int J Nanomedicine*, 2021, 16: 1575–1586. DOI: 10.2147/ijn.S293067.
- [131] Kim K, Yoo H J, Jung J H, et al. Cytotoxic effects of plant sap-

- derived extracellular vesicles on various tumor cell types[J]. *J Funct Biomater*, 2020, 11(2): 22. DOI: 10.3390/jfb11020022.
- [132] Stanly C, Alfieri M, Ambrosone A, *et al.* Grapefruit-derived micro and nanovesicles show distinct metabolome profiles and anticancer activities in the A375 human melanoma cell line[J]. *Cells*, 2020, 9(12): 2722. DOI: 10.3390/cells9122722.
- [133] Raimondo S, Naselli F, Fontana S, *et al.* Citrus limon-derived nanovesicles inhibit cancer cell proliferation and suppress CML xenograft growth by inducing TRAIL-mediated cell death[J]. *Oncotarget*, 2015, 6(23): 19514–19527.
- [134] Raimondo S, Saieva L, Cristaldi M, *et al.* Label-free quantitative proteomic profiling of colon cancer cells identifies acetyl-CoA carboxylase alpha as antitumor target of *Citrus limon*-derived nanovesicles[J]. *J Proteomics*, 2018, 173: 1–11. DOI: 10.1016/j.jprot.2017.11.017.
- [135] Yang M, Liu X, Luo Q, *et al.* An efficient method to isolate lemon derived extracellular vesicles for gastric cancer therapy[J]. *J Nanobiotechnology*, 2020, 18(1): 100. DOI: 10.1186/s12951-020-00656-9.
- [136] Yang M, Luo Q, Chen X, *et al.* Bitter melon derived extracellular vesicles enhance the therapeutic effects and reduce the drug resistance of 5-fluorouracil on oral squamous cell carcinoma[J]. *J Nanobiotechnology*, 2021, 19(1): 259. DOI: 10.1186/s12951-021-00995-1.
- [137] Song H, Canup B S B, Ngo V L, *et al.* Internalization of garlic-derived nanovesicles on liver cells is triggered by interaction with CD98[J]. *ACS Omega*, 2020, 5(36): 23118–23128.
- [138] Greten F R, Grivennikov S I. Inflammation and cancer: triggers, mechanisms, and consequences[J]. *Immunity*, 2019, 51(1): 27–41.
- [139] Kim K, Jung J H, Yoo H J, *et al.* Anti-metastatic effects of plant sap-derived extracellular vesicles in a 3D microfluidic cancer metastasis model[J]. *J Funct Biomater*, 2020, 11(3): 49. DOI: 10.3390/jfb11030049.
- [140] Nazimek K, Bryniarski K. Perspectives in manipulating EVs for therapeutic applications: focus on cancer treatment[J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(13): 4623. DOI: 10.3390/ijms21134623.
- [141] O'Brien K, Breyne K, Ughetto S, *et al.* RNA delivery by extracellular vesicles in mammalian cells and its applications[J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2020, 21(10): 585–606.
- [142] Leidal A M, Huang H H, Marsh T, *et al.* The LC3-conjugation machinery specifies the loading of RNA-binding proteins into extracellular vesicles[J]. *Nat Cell Biol*, 2020, 22(2): 187–199.
- [143] Garcia-Martin R, Wang G, Brandão B B, *et al.* MicroRNA sequence codes for small extracellular vesicle release and cellular retention[J]. *Nature*, 2022, 601(7893): 446–451.
- [144] Votteler J, Ogozara C, Yi S, *et al.* Designed proteins induce the formation of nanocage-containing extracellular vesicles[J]. *Nature*, 2016, 540(7632): 292–295.
- [145] Wu C, Xu Q, Wang H, *et al.* Neutralization of SARS-CoV-2 pseudovirus using ACE2-engineered extracellular vesicles[J]. *Acta Pharm Sin B*, 2021. DOI: 10.1016/j.apsb.2021.09.004.
- [146] Cheng Q, Dai Z, Shi X, *et al.* Expanding the toolbox of exosome-based modulators of cell functions[J]. *Biomaterials*, 2021, 277: 121129. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2021.121129.
- [147] Katakowski M, Buller B, Zheng X, *et al.* Exosomes from marrow stromal cells expressing miR-146b inhibit glioma growth[J]. *Cancer Lett*, 2013, 335(1): 201–204.
- [148] Lou G, Song X, Yang F, *et al.* Exosomes derived from miR-122-modified adipose tissue-derived MSCs increase chemosensitivity of hepatocellular carcinoma[J]. *J Hematol Oncol*, 2015, 8: 122. DOI: 10.1186/s13045-015-0220-7.
- [149] Bose R J C, Uday Kumar S, Zeng Y, *et al.* Tumor cell-derived extracellular vesicle-coated nanocarriers: an efficient theranostic platform for the cancer-specific delivery of anti-miR-21 and imaging agents[J]. *ACS Nano*, 2018, 12(11): 10817–10832.
- [150] Fu Z, Zhang X, Zhou X, *et al.* In vivo self-assembled small RNAs as a new generation of RNAi therapeutics[J]. *Cell Res*, 2021, 31(6): 631–648.
- [151] Hung M E, Leonard J N. A platform for actively loading cargo RNA to elucidate limiting steps in EV-mediated delivery[J]. *J Extracell Vesicles*, 2016, 5: 31027. DOI: 10.3402/jev.v5.31027.
- [152] Jang S C, Kim O Y, Yoon C M, *et al.* Bioinspired exosome-mimetic nanovesicles for targeted delivery of chemotherapeutics to malignant tumors[J]. *ACS Nano*, 2013, 7(9): 7698–7710.
- [153] 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.
- [154] You J Y, Kang S J, Rhee W J. Isolation of cabbage exosome-like nanovesicles and investigation of their biological activities in human cells[J]. *Bioact Mater*, 2021, 6(12): 4321–4332.
- [155] Nasiri Kenari A, Cheng L, Hill A F. Methods for loading therapeutics into extracellular vesicles and generating extracellular vesicles mimetic-nanovesicles[J]. *Methods*, 2020, 177: 103–113. DOI: 10.1016/j.ymeth.2020.01.001.
- [156] Lamichhane T N, Raiker R S, Jay S M. Exogenous DNA loading into extracellular vesicles via electroporation is size-dependent and enables limited gene delivery[J]. *Mol Pharm*, 2015, 12(10): 3650–3657.
- [157] Pomatto M A C, Bussolati B, D'Antico S, *et al.* Improved loading

- of plasma-derived extracellular vesicles to encapsulate antitumor miRNAs[J]. *Mol Ther Methods Clin Dev*, 2019, 13: 133–144. DOI: 10.1016/j.omtm.2019.01.001.
- [158] 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.
- [159] Hood J L, Scott M J, Wickline S A. Maximizing exosome colloidal stability following electroporation[J]. *Anal Biochem*, 2014, 448: 41–49. DOI: 10.1016/j.ab.2013.12.001.
- [160] Bosch S, de Beaufort L, Allard M, *et al.* Trehalose prevents aggregation of exosomes and cryodamage[J]. *Sci Rep*, 2016, 6: 36162. DOI: 10.1038/srep36162.
- [161] Fuhrmann G, Serio A, Mazo M, *et al.* Active loading into extracellular vesicles significantly improves the cellular uptake and photodynamic effect of porphyrins[J]. *J Control Release*, 2015, 205: 35–44. DOI: 10.1016/j.jconrel.2014.11.029.
- [162] Lennaárd A J, Mamand D R, Wiklander R J, *et al.* Optimised electroporation for loading of extracellular vesicles with doxorubicin[J]. *Pharmaceutics*, 2021, 14(1): 38. DOI: 10.3390/pharmaceutics14010038.
- [163] Felgner P L, Gadek T R, Holm M, *et al.* Lipofection: a highly efficient, lipid-mediated DNA-transfection procedure[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1987, 84(21): 7413–7417.
- [164] Gresch O, Engel F B, Nestic D, *et al.* New non-viral method for gene transfer into primary cells[J]. *Methods*, 2004, 33(2): 151–163.
- [165] Ohno S, Takahashi 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.
- [166] Zhang D, Lee H, Zhu Z, *et al.* Enrichment of selective miRNAs in exosomes and delivery of exosomal miRNAs *in vitro* and *in vivo*[J]. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2017, 312(1): L110–L121.
- [167] Patel N, Kommineni N, Surapaneni S K, *et al.* Cannabidiol loaded extracellular vesicles sensitize triple-negative breast cancer to doxorubicin in both *in-vitro* and *in vivo* models[J]. *Int J Pharm*, 2021, 607: 120943. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2021.120943.
- [168] Haney M J, Klyachko N L, Zhao Y, *et al.* Exosomes as drug delivery vehicles for Parkinson's disease therapy[J]. *J Control Release*, 2015, 207: 18–30. DOI: 10.1016/j.jconrel.2015.03.033.
- [169] 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. DOI: 10.3390/cells10092413.
- [170] Rajendran R L, Paudel S, Gangadaran P, *et al.* Extracellular vesicles act as nano-transporters of tyrosine kinase inhibitors to revert Iodine avidity in thyroid cancer[J]. *Pharmaceutics*, 2021, 13(2): 248. DOI: 10.3390/pharmaceutics13020248.
- [171] Tkach M, Théry C. Communication by extracellular vesicles: where we are and where we need to go[J]. *Cell*, 2016, 164(6): 1226–1232.
- [172] 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.
- [173] Voldborg B R, Damstrup L, Spang-Thomsen M, *et al.* Epidermal growth factor receptor (EGFR) and EGFR mutations, function and possible role in clinical trials[J]. *Ann Oncol*, 1997, 8(12): 1197–1206.
- [174] Friedlaender A, Subbiah V, Russo A, *et al.* EGFR and HER2 exon 20 insertions in solid tumours: from biology to treatment[J]. *Nat Rev Clin Oncol*, 2022, 19(1): 51–69.
- [175] Hung M E, Leonard J N. Stabilization of exosome-targeting peptides via engineered glycosylation[J]. *J Biol Chem*, 2015, 290(13): 8166–8172.
- [176] Kooijmans S A A, Gitz-Francois J J J M, Schiffelers R M, *et al.* Recombinant phosphatidylserine-binding nanobodies for targeting of extracellular vesicles to tumor cells: a plug-and-play approach[J]. *Nanoscale*, 2018, 10(5): 2413–2426.
- [177] Kooijmans S A A, Aleza C G, Roffler S R, *et al.* Display of GPI-anchored anti-EGFR nanobodies on extracellular vesicles promotes tumour cell targeting[J]. *J Extracell Vesicles*, 2016, 5: 31053. DOI: 10.3402/jev.v5.31053.
- [178] Peng L H, Wang M Z, Chu Y, *et al.* Engineering bacterial outer membrane vesicles as transdermal nanoplatforms for photo-TRAIL-programmed therapy against melanoma[J]. *Sci Adv*, 2020, 6(27): eaba2735. DOI: 10.1126/sciadv.aba2735.
- [179] Gujrati V, Kim S, Kim S H, *et al.* Bioengineered bacterial outer membrane vesicles as cell-specific drug-delivery vehicles for cancer therapy[J]. *ACS Nano*, 2014, 8(2): 1525–1537.
- [180] Kim O Y, Dinh N T H, Park H T, *et al.* Bacterial protoplast-derived nanovesicles for tumor targeted delivery of chemotherapeutics[J]. *Biomaterials*, 2017, 113: 68–79. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2016.10.037.
- [181] Zhang P, Dong B, Zeng E, *et al.* *In vivo* tracking of multiple tumor exosomes labeled by phospholipid-based bioorthogonal conjugation[J]. *Anal Chem*, 2018, 90(19): 11273–11279.
- [182] Zhang E, Liu Y, Han C, *et al.* Visualization and identification of bioorthogonally labeled exosome proteins following systemic administration in mice[J]. *Front Cell Dev Biol*, 2021, 9: 657456. DOI: 10.3389/fcell.2021.657456.
- [183] Wang M, Altinoglu S, Takeda Y S, *et al.* Integrating protein engineering and bioorthogonal click conjugation for extracellular vesicle modulation and intracellular delivery[J]. *PLoS One*, 2015, 10(11): e0141860. DOI: 10.1371/journal.pone.0141860.

- [184] Lim G T, You D G, Han H S, *et al.* Bioorthogonally surface-edited extracellular vesicles based on metabolic glycoengineering for CD44-mediated targeting of inflammatory diseases[J]. *J Extracell Vesicles*, 2021, 10(5): e12077. DOI: 10.1002/jev2.12077.
- [185] Scinto S L, Bilodeau D A, Hincapie R, *et al.* Bioorthogonal chemistry[J]. *Nat Rev Methods Primers*, 2021, 1: 30. DOI: 10.1038/s43586-021-00028-z.
- [186] Bird R E, Lemmel S A, Yu X, *et al.* Bioorthogonal chemistry and its applications[J]. *Bioconjug Chem*, 2021, 32(12): 2457–2479.
- [187] Song S, Shim M K, Lim S, *et al.* *In situ* one-step fluorescence labeling strategy of exosomes via bioorthogonal click chemistry for real-time exosome tracking *in vitro* and *in vivo*[J]. *Bioconjug Chem*, 2020, 31(5): 1562–1574.
- [188] Pham T C, Jayasinghe M K, Pham T T, *et al.* Covalent conjugation of extracellular vesicles with peptides and nanobodies for targeted therapeutic delivery[J]. *J Extracell Vesicles*, 2021, 10(4): e12057. DOI: 10.1002/jev2.12057.
- [189] Kooijmans S A A, Fliervoet L A L, van der Meel R, *et al.* PEGylated and targeted extracellular vesicles display enhanced cell specificity and circulation time[J]. *J Control Release*, 2016, 224: 77–85. DOI: 10.1016/j.jconrel.2016.01.009.
- [190] Haraszti R A, Miller R, Didiot M C, *et al.* Optimized cholesterol-siRNA chemistry improves productive loading onto extracellular vesicles[J]. *Mol Ther*, 2018, 26(8): 1973–1982.
- [191] Biscans A, Haraszti R A, Echeverria D, *et al.* Hydrophobicity of lipid-conjugated siRNAs predicts productive loading to small extracellular vesicles[J]. *Mol Ther*, 2018, 26(6): 1520–1528.
- [192] Didiot M C, Haraszti R A, Aronin N, *et al.* Loading of extracellular vesicles with hydrophobically modified siRNAs[J]. *Methods Mol Biol*, 2018, 1740: 199–214. DOI: 10.1007/978-1-4939-7652-2_16.
- [193] Yerneni S S, Lathwal S, Shrestha P, *et al.* Rapid on-demand extracellular vesicle augmentation with versatile oligonucleotide tethers[J]. *ACS Nano*, 2019, 13(9): 10555–10565.
- [194] Zhang M, Xiao B, Wang H, *et al.* Edible ginger-derived nano-lipids loaded with doxorubicin as a novel drug-delivery approach for colon cancer therapy[J]. *Mol Ther*, 2016, 24(10): 1783–1796.
- [195] Zhang M, Yang C, Yan X, *et al.* Highly biocompatible functionalized layer-by-layer Ginger lipid nano vectors targeting P-selectin for delivery of doxorubicin to treat colon cancer[J]. *Adv Ther*, 2019, 2(12): 1900129. DOI: 10.1002/adtp.201900129.
- [196] Li Z, Wang H, Yin H, *et al.* Arrowtail RNA for ligand display on ginger exosome-like nanovesicles to systemic deliver siRNA for cancer suppression[J]. *Sci Rep*, 2018, 8(1): 14644. DOI: 10.1038/s41598-018-32953-7.
- [197] Wang Q, Zhuang X, Mu J, *et al.* Delivery of therapeutic agents by nanoparticles made of grapefruit-derived lipids[J]. *Nat Commun*, 2013, 4: 1867. DOI: 10.1038/ncomms2886.
- [198] Niu W, Xiao Q, Wang X, *et al.* A biomimetic drug delivery system by integrating grapefruit extracellular vesicles and doxorubicin-loaded heparin-based nanoparticles for glioma therapy[J]. *Nano Lett*, 2021, 21(3): 1484–1492.
- [199] Zhuang Q, Xu J, Deng D, *et al.* Bacteria-derived membrane vesicles to advance targeted photothermal tumor ablation[J]. *Biomaterials*, 2021, 268: 120550. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2020.120550.
- [200] Meehan K, Vella L J. The contribution of tumour-derived exosomes to the hallmarks of cancer[J]. *Crit Rev Clin Lab Sci*, 2016, 53(2): 121–131.



【专家介绍】邱宏：理学博士，中国科学院上海药物研究所研究员，课题组长，博士生导师；先后获得美国心脏协会（American Heart Association）博士后基金（Postdoctoral Fellowship）、科学家发展基金（Scientist Development Grant），上海市浦江人才计划，上海市海外高层次人才计划和中国科学院百人计划支持。目前担任中国生物化学与分子生物学学会糖复合物分会理事、中国生物工程协会糖生物工程专业委员会委员和中国生化制药工业协会专家委员会委员。2021年起受邀担任国际糖复合物组织官方期刊 *Glycoconjugate Journal* 的 Associate Editor。

2010年毕业于中国科学院上海药物研究所并获博士学位；其后以博士后和 Senior Research Associate 身份在世界著名糖科学研究机构佐治亚大学复杂碳水化合物研究中心从事科研工作，2019年回国建立课题组从事糖和糖复合物的基础与转化研究。主要研究方向有：1）糖和糖复合物在发育、组织稳态维持和疾病发生、发展中的作用及以此为基础的疾病诊疗手段研发；2）EVs 生物学及其在疾病诊疗中的应用；3）适配体筛选及适配体在疾病诊疗中的应用。研究结果先后以通信作者和第一作者发表在 *Nature Methods*、*Molecular & Cellular Proteomics*、*Journal of Biological Chemistry*、*Acta Pharmaceutica Sinica B* 和 *Glycoconjugate Journal* 等期刊。