DOI:10.3969/j.issn.2097-7948.2026.01.025

· 综述 ·

赋能精准再生修复的工程化外泌体构建的研究进展

吴潘,马莹,安桐,黎达琴,王润轩,宋会娟,何宁宁*,刘强*
中国医学科学院 & 北京协和医学院放射医学研究所,天津 300192

摘要: 外泌体作为细胞间通讯的关键介质,已成为无细胞疗法领域极具前景的候选者。与传统干细胞疗法相比,外泌体疗法具有免疫原性低和有效跨越生物屏障的优势。然而,天然外泌体在发挥疗效时易受到其快速清除、靶向能力有限以及载荷不足的阻碍。为了克服这些瓶颈,该领域已实现了从使用天然外泌体向开发下一代工程化外泌体的范式转变。全面总结近 5 年(2021 至 2026 年)在外泌体工程化策略方面的进展,主要围绕膜蛋白修饰与内容物装载两大策略;详细探讨了膜支架蛋白的发展历程,对比评估了外源性装载策略(如电穿孔、皂苷透化)与基于基因工程介导的内源性装载系统;重点阐述了这些工程化外泌体在特定疾病中的治疗效能;前瞻性地展望了人工智能(如 AlphaFold2 和 RFdiffusion)在支架蛋白理性设计和微型结合蛋白从头设计方面的可能性。下一代外泌体有望突破现有技术瓶颈,发展为用于精准损伤修复和基因治疗的智能纳米药物。

关键词: 工程化外泌体;无细胞疗法;膜蛋白修饰;药物装载;人工智能
中图分类号: R456

基金项目: 国家自然科学基金项目(82574027);天津市自然科学基金项目(24JCZDJC00440,24JCYBJC00820)
* 通信作者
利益冲突: 作者均声明无利益冲突
伦理批件: 不需要
知情同意: 不需要
引用本文: 吴潘, 马莹, 安桐, 等. 赋能精准再生修复的工程化外泌体构建的研究进展[J]. 再生医学研究, 2026,1(1): 14-41. doi: 10.3969/j.issn.2097-7948.2026.01.025.

Research advances on the construction of engineered exosomes for precision regenerative repair

WU Pan, MA Ying, AN Tong, LI Daqin, WANG Runxuan, SONG Huijuan, HE Ningning*, LIU Qiang*
Institute of Radiation Medicine, Chinese Academy of Medical Sciences & Peking Union Medical College, Tianjin 300192, China

Abstract: Exosomes, as key mediators of intercellular communication, have emerged as highly promising candidates in the field of cell-free therapy. Compared to traditional stem cell therapies, exosome therapy offers the advantages of low immunogenicity and the ability to effectively cross biological barriers. However, the therapeutic efficacy of natural exosomes is often hindered by their rapid clearance, limited targeting capabilities, and insufficient cargo capacity. To overcome these bottlenecks, the field has undergone a paradigm shift from the use of natural exosomes to the development of next-generation engineered exosomes. This review comprehensively summarizes the advances in exosome engineering strategies

Fund program: National Natural Science Foundation of China (82574027); Tianjin Natural Science Foundation Project (24JCZDJC00440,24JCYBJC00820)
* **Corresponding author**
Conflicts of interest: Authors all declare no conflicts of interest.
Ethical approval: Not required.
Informed consent: Not required.
Cite this article: Wu P, Ma Y, An T, *et al.* Research advances on the construction of engineered exosomes for precision regenerative repair [J]. Zaisheng Yixue Yanjiu, 2026,1(1): 14-41. doi: 10.3969/j.issn.2097-7948.2026.01.025.

over the past five years (from 2021 to 2026), focusing primarily on two major approaches: membrane protein modification and cargo loading. The article discusses in detail the developmental history of membrane scaffold proteins, while also comparatively evaluating exogenous loading strategies (such as electroporation and saponin permeabilization) and genetic engineering-mediated endogenous loading systems. Furthermore, this paper highlights the therapeutic efficacy of these engineered exosomes in specific diseases. Finally, this review provides a forward-looking perspective on the potential of artificial intelligence (such as AlphaFold2 and RFdiffusion) in the rational design of scaffold proteins and the *de novo* design of mini-binders. Next-generation exosomes are expected to break through existing technological bottlenecks and evolve into smart nanomedicines for precise injury repair and gene therapy.

Key words: Engineered exosomes; Cell-free therapy; Membrane protein modification; Cargo loading; Artificial intelligence

细胞损伤及其组织再生障碍构成了诸多疾病的病理基础，干细胞治疗（stem cell therapy，SCT）凭借自我更新和多向分化潜能，在心肌梗死、脊髓损伤、肝衰竭等疾病模型中，可以显著改善受损组织的结构和功能[1]。尽管使用前景广阔，但 SCT 在免疫原性、致瘤风险、体内驻留率等方面仍面临较多挑战[2]，尤其在中枢神经系统疾病治疗中，干细胞因体积较大（直径 10 ~ 30 μm）难以穿越血脑屏障，而静脉注射又易滞留肺部微血管引发“肺首过效应”（图 1），难以兼顾安全性与有效性。

证据[3]表明，干细胞修复组织的主要机制并非“细胞替代”，而是旁分泌作用（paracrine effects）。通过探究其活性成分发现，仅注射干细胞的条件培养基（conditioned medium，CM）即可达到相似疗效[4]。进一步研究[5]证实，CM 中发挥核心作用的活性成分正是外泌体（exosomes）。作为细胞间通讯的天然介质，外泌体传递核酸、蛋白质、脂质等复杂分子信息，参与生理稳态的维持，更在病理进程中扮演着关键角色[6]，其独特的膜脂质结构还赋予了血液循环稳定性，使其能够穿越诸如血脑屏障等生理屏障的内在能力（图 1）[7-8]。

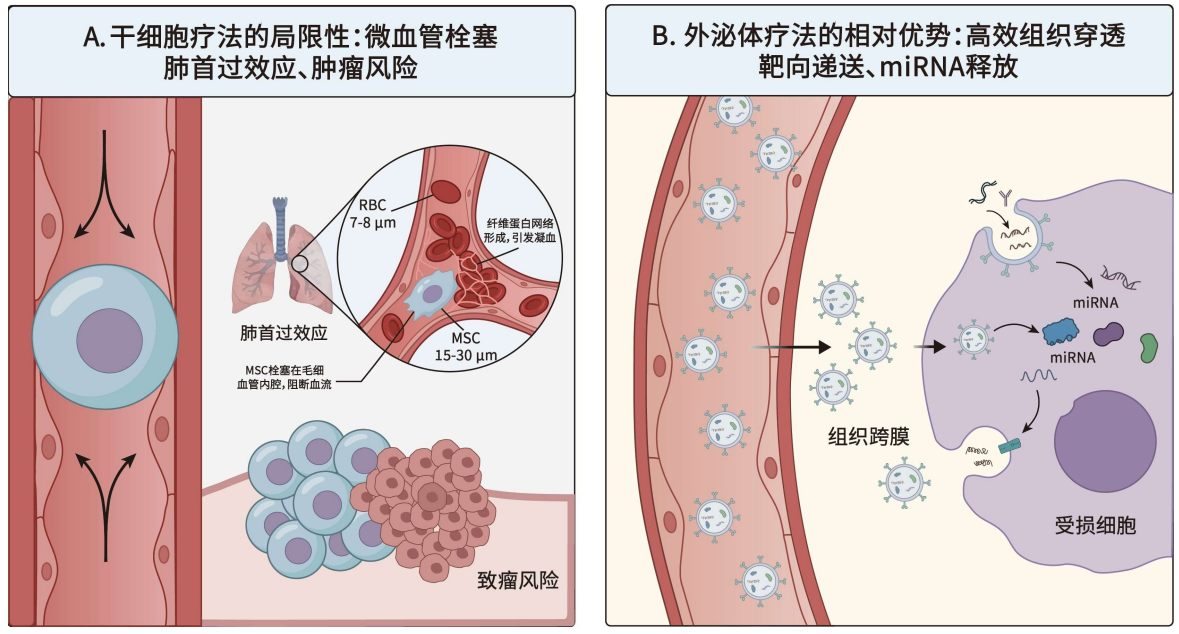


图 1　SCT 疗法与外泌体疗法在静脉递送中的机制与局限性对比示意图。SCT：干细胞疗法；MSC：间充质干细胞；RBC：红细胞；miRNA：微小 RNA。

Figure 1　Schematic diagram comparing the mechanisms and limitations of SCT and exosome therapy in intravenous delivery. SCT: stem cell therapy; MSC: mesenchymal stem cell; RBC: red blood cell; miRNA: microRNA.

然而，天然外泌体用于治疗的潜力受限于其内生的异质性、有限的靶向特异性以及较低的药物装载效率[9]，其在体内的快速清除（主要是肝脾的单核吞噬系统）也阻碍了其临床转化[10]。针对上述痛点，工程化外泌体（engineered exosomes）应运而生——这是一种通过基因工程、化学修饰与其他生物物理手段，对亲本细胞或分离后的外泌体进行理性设计的复合功能载体[11-12]。当前工程化策略已从简单的共孵育装载，演变为涵盖表面膜蛋白精密设计、内容物主动分选，最终实现智能响应释放的全方位改造。特别是前列腺素 F2 受体负性调节因子（prostaglandin F2 receptor negative regulator，PTGFRN）、脑富含膜附着信号蛋白 1（brain abundant membrane attached signal protein 1，BASP1）等新型高密度支架蛋白的发现，彻底改变了表面展示的效率[13]，而基于 RNA 结合蛋白（RNA-binding proteins，RBPs）的主动装载系统，则实现了基因药物的定点富集[14-15]。

随着人工智能（artificial intelligence，AI）技术爆发，以 AlphaFold2、RFdiffusion 为代表的结构分子生物学智能分析工具正在重塑外泌体工程的研发流程[16-17]，使得从头设计（*de novo* design）具有特定构象的融合蛋白与高亲和力结合子成为可能[18]，并将该领域从传统的“试错法筛选”引向“计算机辅助理性设计”的学科交叉深水区[19]。

1 外泌体工程化构建策略概况

为了改善天然外泌体存在的痛点，目前的外泌体工程化改造主要聚焦于膜蛋白修饰与内容物装载两大核心维度（图 2）。在膜蛋白修饰方面，通过基因工程将功能性配体与外泌体支架蛋白融合表达形成特异性的归巢配体[12]；此外，化学修饰法通过点击化学反应或脂质锚定，将分子直接偶联在外泌体表面，实现表面性质的调控[11]。膜融合技术构建的杂合外泌体（hybrid exosomes）也为生物合成杂合载体的设计提供了范本[20]。

在内容物装载领域，根据装载时间与对象的不同可分为外源性装载和内源性装载（图 2）。外源性装载包括被动装载和主动装载；内源性装载则是利用细胞内源性通路完成 RNA 或蛋白的包裹[21-22]。该策略利用细胞天然的生物合成与分选机制，在细胞生成外泌体的过程中自动获取药物并包装入囊泡。近年来该方向研发出了一批基于 RBPs 特定序列识别技术和基于模块化蛋白工程的设计，有效提高了货物的定向富集率[13,15]。

经工程化改造的外泌体，成功具备智能药物递送系统的特质，可以特异性识别并结合靶细胞表面的受体，通过膜融合或内吞作用将治疗性货物释放至细胞质中，从而诱导细胞凋亡、基因沉默等生物学效应，实现疾病精准治疗（图 2）[5]。

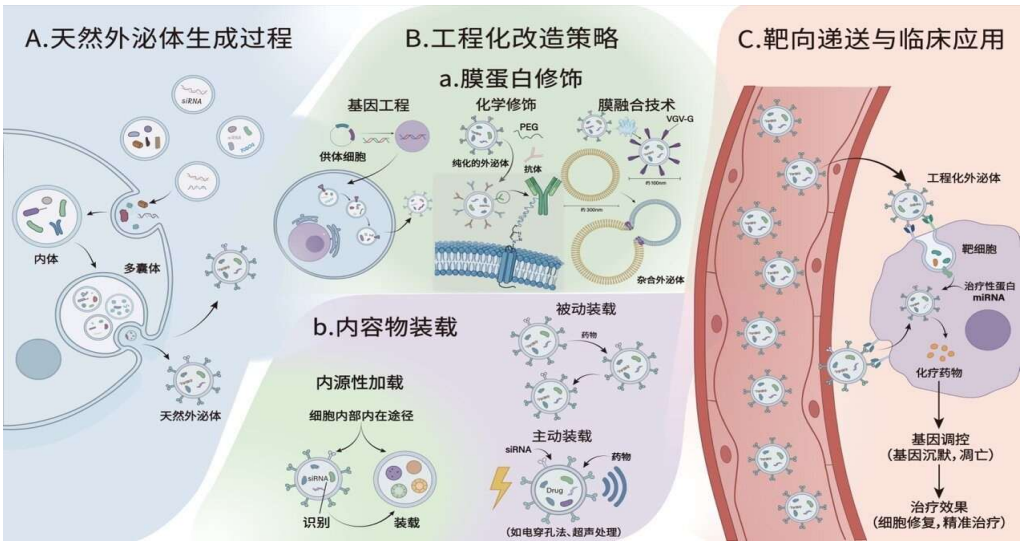


图 2 外泌体的天然生成、工程化改造策略及其靶向递送与应用示意图。MVB：多囊体；PEG：聚乙二醇；siRNA：小干扰 RNA；RBP：RNA 结合蛋白。

Figure 2 Schematic diagram of natural exosome biogenesis, engineering strategies, and target delivery with therapeutic applications. MVB: multivesicular body; PEG: polyethylene glycol; siRNA: small interfering RNA; RBP: RNA-binding protein.

2　从基础锚定到高级组装的多维膜蛋白修饰策略

2.1　基因工程改造策略

基因工程改造是实现外泌体表面修饰最经典的策略，核心原理是对外泌体的供体细胞进行转染或病毒转导，使其表达支架蛋白（scaffold protein）、连接肽（linker）及靶向配体（targeting ligand）共同组成的融合蛋白[12]。

对外泌体进行基因工程改造的过程中，核心瓶颈在于筛选具备一定特征的优质支架蛋白，特征基本包含：其一，具备高效的外泌体定向分选效率；其二，具备较高的结构稳定性，用于承载载荷的融合且不干扰外泌体的生物发生[23]。在研究早期，溶酶体相关膜蛋白 2b（lysosome-associated membrane protein 2b，Lamp2b）与四跨膜蛋白家族（tetraspanins）是主流的候选支架。然而，随着对外泌体货物分选机制理解的深入和高通量支架蛋白筛选技术的完善，以 PTGFRN、BASP1 为代表的新一代高性能支架蛋白的发现，突破了表面展示的密度瓶颈与稳定性局限，极大地优化了工程化外泌体的递送效能[13,24-25]（图 3）。

2.1.1　第一代支架：Lamp2b 及其局限性

Lamp2b 是膜蛋白修饰领域应用最为广泛的经典支架蛋白。作为一种典型的 I 型跨膜蛋白，Lamp2b 在结构上拥有一个广阔的 N 端胞外域、一段跨膜螺旋和一段短小的 C 端胞质尾区（图 3）。这种拓扑结构使其便于利用基因工程将靶向配体融合于 Lamp2b 的 N 端信号肽，并在分泌外泌体时将这些配体有效展示在膜表面[12]。

Alvarez-Erviti 等[24] 在 2011 年利用这一原理，首次将狂犬病毒糖蛋白肽（rabies virus glycoprotein peptide，RVG）与 Lamp2b 融合，成功越过血脑屏障将小干扰 RNA（small interfering RNA，siRNA）递送至神经元，这一标志性成果确立了 Lamp2b 在外泌体靶向递送的绝对地位。在前人的基础上，Lamp2b 的表面展示技术进入了繁荣的拓荒期，靶向谱系被极大丰富。研究人员不仅将肿瘤归巢肽融合于 N 端来增强对实体瘤的深度穿透，还将心肌靶向肽（cardiac targeting peptide，CTP）、软骨靶向肽（chondrocyte affinity peptide，CAP）等引入该系统，成功实现了工程化外泌体在心血管与骨关节等复杂疾病模型中的病灶富集[26-30]。

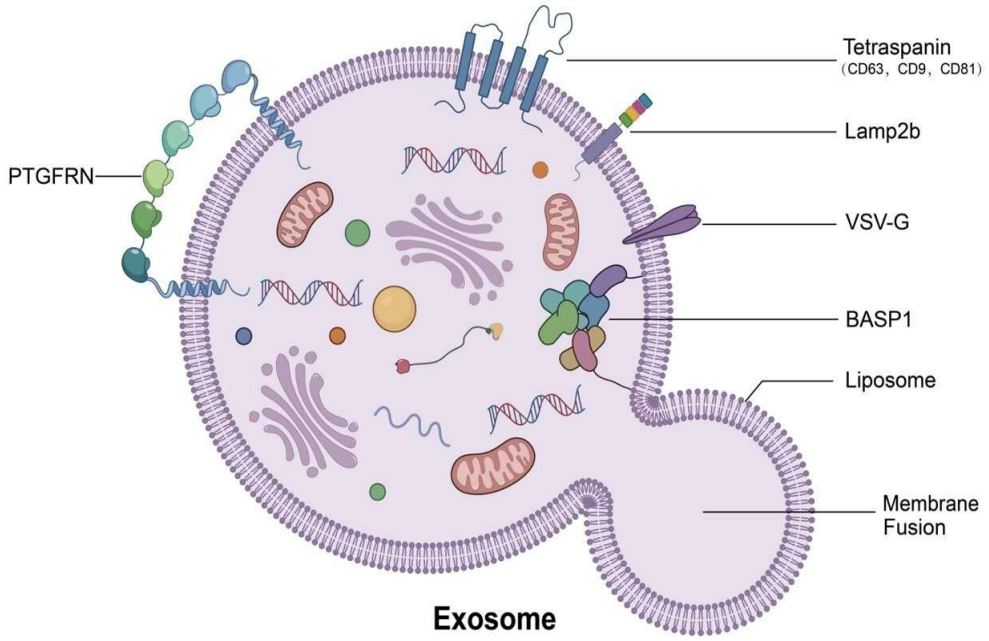


图 3　工程化外泌体中常用支架蛋白的拓扑结构与膜融合技术示意图。Lamp2b：溶酶体相关膜蛋白 2b；VSV-G：水疱性口炎病毒糖蛋白；BASP1：脑富含膜附着信号蛋白 1；PTGFRN：前列腺素 F2 受体负性调节因子。

Figure 3　Schematic diagram of the topological structures of commonly used scaffold proteins in engineered exosomes and membrane fusion. Lamp2b: lysosome-associated membrane protein 2b; VSV-G: vesicular stomatitis virus G protein; BASP1: brain abundant membrane attached signal protein 1; PTGFRN: prostaglandin F2 receptor negative regulator.

伴随应用场景的日益复杂,研究的着重点逐渐从单纯的线性短肽融合向展示分子量更大、空间构象更复杂的功能模块演化,如单链抗体(single-chain variable fragment,scFv)、双靶向嵌合多肽(dual-targeting chimeric peptide,DTCP)[31-32]。尽管 Lamp2b 为外泌体功能化搭建了富有活力的实践模型,但随着研究的深入,其在生物学特性和递送效率的固有缺陷逐渐浮现:在受体与配体的相互作用中,往往需要依赖"多价效应"(即配体的高密度簇集)来获得高亲和力。然而,Lamp2b 在外泌体膜上的天然表达存在饱和限度,难以实现表面配体的高拷贝数富集。这种表面展示密度的不足,导致工程化外泌体(特别是面对低亲和力受体时)无法形成有效的结合,进而大幅降低了其在复杂体内环境中的靶向递送效率。

Lamp2b 胞外区的重度糖基化修饰是另一重要限制因素。其多个 N-糖基化位点连接的致密糖被膜虽可保护蛋白免受酶解,但在工程化应用中却产生显著的空间位阻效应,遮蔽融合于 N 端的小分子靶向肽,降低其与受体的结合亲和力。针对这一复杂困境,Hung 等[33]巧妙地在靶向肽序列中引入 GNSTM 糖基化基序,一种由甘氨酸(glycine)、天冬酰胺(asparagine)、丝氨酸(serine)、苏氨酸(threonine)、甲硫氨酸(methionine)组成的序列,利用基序自身的糖基化有效抵抗了供体细胞内的酶解降解,稳定了靶向肽的展示率。后续研究者在这一基础上,开发了更多为解决空间位阻效应而设计的连接肽。这些延长的连接肽不仅缓冲了结构张力,保障了大分子蛋白的正确折叠,还有效穿过了外泌体表面的位阻层,从而实现了与受体的高效结合。

2.1.2 四跨膜蛋白:顺势而为的结构限制突破

四跨膜蛋白超家族(tetraspanins)以 CD63、CD9 和 CD81 为典型代表,鉴于它们在外泌体膜上高度富集又保守表达,长久以来被视为外泌体鉴定和纯化的关键标志物[34-35]。从分子拓扑结构上看,这类蛋白有着 4 个跨膜结构域,在膜外形成小胞外环(EC1)和大胞外环(EC2)两个独特结构单元,并且其 N 端以及 C 端均位于胞质侧(图 3)[36]。这种特别的膜拓扑学特征虽然让其有了作为膜骨架的稳定性,但由于其末端都位于腔内,无法像 Lamp2b 一样直接通过末端融合使功能配体胞外展示[25]。为了打破这一限制,早期的工程化方法曾尝试直接将功能性小肽插入较大的 EC2 环中,以达成表面暴露的目的。而 EC2 区通常包含维持蛋白结构的关键——半胱氨酸残基[36],对构象变化十分敏感,插入外源序列往往会使蛋白的正确折叠与二硫键形成受到破坏,造成融合蛋白滞留于内质网中,无法顺利地通过高尔基体分选进入多囊体,最终造成外泌体产率下降或修饰失败[13,37]。针对上述结构局限性,外泌体工程化研究已从单纯的对拓扑结构进行暴力插入转向了对拓扑结构的顺势利用。一方面,为了不破坏膜蛋白折叠,SpyTag/SpyCatcher 等生物正交反应系统被引入用于 EC2 环的后修饰,实现了配体的模块化组装[11,38-39];另一方面,也有研究者[25,36]巧妙地利用了四跨膜蛋白 N/C 端天然朝向外泌体腔内的特性,将其转变为一种高效的"腔内货物装载"锚点,开发了一款外泌体细胞内转运(exosomal transfer into cells,EXOtic)系统,通过将 CD63 的 C 端与古细菌核糖体蛋白 L7Ae 融合,利用 L7Ae 对特定 RNA 结构基序(C/D box)的纳摩尔级高亲和力,成功将携带相应基序的工程化信使 RNA(messenger RNA,mRNA)主动招募并富集至外泌体内部[15]。这一策略将四跨膜蛋白转化为实现胞质内核酸药物高效包载的优势平台,为解决外泌体载药率低的难题提供了全新的解决方案[22]。

2.1.3 基于蛋白质组学筛选的新型外泌体支架蛋白:PTGFRN 与 BASP1

为了突破 Lamp2b 等传统支架蛋白在表达丰度与展示稳定性上的局限,Codiak BioSciences 研究团队[40]采用大规模蛋白质组学筛选技术,对不同细胞系来源的外泌体蛋白组分开展了深度对比分析。该筛选工作发现了两种具有革命性意义的新型支架蛋白,分别是 PTGFRN 和 BASP1。

PTGFRN 作为膜蛋白修饰新一代基石,展现出比传统支架更出色的特性。从结构生物学来讲,PTGFRN 属于免疫球蛋白超家族(immunoglobulin protein super family,IgSF),是一种拥有 6 个胞外 IgV 结

构域(IgV 1-6)的 I 型单次跨膜糖蛋白(图 3)[41]。相较于 Lamp2b,PTGFRN 的过表达能够在外泌体中实现多对数级的富集[13],其介导的融合表达使 95.41% 的外泌体表面均带有可检测的靶蛋白(相较于 Lamp2b 检出率仅为 10.5%)。PTGFRN 极高的装载效率,结合其巨大的胞外域极高的融合耐受性,使其可以稳定、高密度地展示包括 scFv、白细胞介素-12(interleukin-12,IL-12)在内的大分子蛋白[13,42]。但 PTGFRN 也并非没有劣势,由于外泌体中富含去整合素样金属蛋白酶 10(A disintegrin and metalloprotease domain 10,ADAM10),其可能会在囊泡生物发生或释放后对 PTGFRN 发生位点特异性切割,导致表面融合展示的蛋白脱落。为了解决这一问题,研究人员[13]通过精确定位并移除假定的ADAM10 切割位点,开发出了抗蛋白水解的优化型截短体(如 Δ687),该策略有效防止了降解,并实现了较高丰度的外泌体表面蛋白展示。

与 PTGFRN 工程化的方向不同,BASP1 则在外泌体的腔内装载领域开辟了全新赛道。跟跨膜蛋白有所不同,BASP1 不含跨膜结构域,而是凭借其 N 端的豆蔻酰化(myristoylation)修饰,特异性地锚定在质膜内侧的磷脂酰肌醇-4,5-二磷酸富集区(图 3)[43-44]。这种定位于膜胞质侧(即外泌体腔内侧)的拓扑学属性,令其成为封装胞内活性分子的理想平台[13]。通过把 Cre 重组酶或 RBPs 等治疗性内容物融合至 BASP1 的 C 端[13](同时期也有研究[14]利用同理的膜锚定策略装载 Cas9 核糖核蛋白),研究人员[45]实现了这些货物蛋白向外泌体内部的主动分选与富集。基于 BASP1 的这种物理封装策略,利用外泌体脂质双分子层给脆弱蛋白质货物提供的天然屏障,有效隔绝了血浆中蛋白酶的降解以及中和抗体的识别,极大地增进了基因编辑酶和胞内靶点药物在体内递送过程中的生物利用度与安全性。

以上主流外泌体工程化支架蛋白特性与应用对比见表 1[13,15,24,26,46-49]。

表 1　主流外泌体工程化支架蛋白特性与应用对比

Table 1　Comparison of characteristics and applications of mainstream scaffold proteins for exosome engineering

名称	类型	拓扑结构	核心优势	主要局限	应用场景	代表研究
Lamp2b	I 型跨膜蛋白	N 端胞外,单次跨膜	历史悠久,N 端易于融合多肽配体	表达丰度低,易降解,糖基化干扰	脑靶向(RVG),肿瘤穿透(iRGD)	[24,26,46]
PTGFRN	Ig 超家族糖蛋白	单次跨膜,巨大的 N 端胞外域(IgV)	极高密度展示,富集效率高,耐受大蛋白融合	需防止 ADAM10 切割	免疫微环境重塑(IL-12),大分子展示 DARPins	[13,47]
BASP1	膜内周蛋白	N 端豆蔻酰化锚定在内膜	腔内装载,不影响表面性质	无法用于表面展示	核糖核蛋白(Cas9 RNP)	[48]
CD63/CD9/CD81	四跨膜蛋白	N/C 端胞内,两个胞外环	天然标志物,丰度高	表面修饰空间小,易破坏结构	EXOtic 系统(L7Ae)	[15]
VSV-G	病毒糖蛋白	三聚体跨膜	具备内体逃逸能力,广泛的细胞亲嗜性	具有免疫原性,可能引起非特异性摄取	胞质蛋白递送,mRNA 主动装载	[49]

Lamp2b:溶酶体相关膜蛋白 2b;PTGFRN:前列腺素 F2 受体负性调节因子;BASP1:脑富含膜附着信号蛋白 1;CD63/CD9/CD81(四跨膜蛋白家族):白细胞分化抗原 63/9/81;IgV:免疫球蛋白可变区;ADAM10:去整合素样金属蛋白酶 10;RVG:狂犬病毒糖蛋白肽;iRGD:内部 RGD 肽(肿瘤穿透肽);IL-12:白细胞介素-12;DARPins:锚蛋白重复序列衍生蛋白;Cas9 RNP:Cas9 核糖核蛋白复合物;EXOtic:外泌体细胞内转运;L7Ae:古细菌 RNA 结合蛋白 L7Ae;mRNA:信使 RNA。

Lamp2b: lysosome-associated membrane protein 2b; PTGFRN: prostaglandin F2 receptor negative regulator; BASP1: brain abundant membrane attached signal protein 1; CD63/CD9/CD81: cluster of differentiation 63/9/81 (tetraspanins); IgV: immunoglobulin variable region; ADAM10: A disintegrin and metalloprotease domain 10; RVG: rabies virus glycoprotein peptide; iRGD: internalizing RGD peptide; IL-12: interleukin-12; DARPins: designed ankyrin repeat proteins; Cas9 RNP: Cas9 ribonucleoprotein; EXOtic: EXOsomal transfer into cells; L7Ae: archaeal RNA-binding protein L7Ae; mRNA: messenger RNA.

2.2 膜蛋白表面修饰的化学修饰策略

尽管基于基因工程的膜蛋白修饰策略奠定了外泌体表面展示技术的基础，但在实际应用中受限于生物“中心法则”，该方法只能让外泌体携带基因编码的产物（即蛋白质或 RNA）。为了突破这一固有的生物学瓶颈，化学修饰法（chemical modification）因其可以连接任何化学物质，故而成为膜蛋白修饰的另一大研究领域。

区别于基因工程法通过转染质粒或病毒载体修改供体细胞的基因表达，并依赖细胞自身的生物合成机制（转录、翻译、蛋白折叠、分选），将特定的功能蛋白或 RNA 装载进外泌体并最终分泌，化学/生物物理修饰策略不再依赖细胞内的生物合成机器来完成所有修饰，而是利用反应条件温和、特异性极高的化学或生物物理手段，在外泌体分泌后对其表面进行精准改造（表 2）。例如，点击化学（铜催化叠氮-炔环加成）可在水相缓冲液中快速、高特异性地将配体偶联至外泌体表面，且不改变外泌体的尺寸及其受体细胞的粘附与内化行为，提示反应条件对外泌体结构与功能较为温和[50]。这一突破生物合成限制的思路，使包括聚乙二醇（polyethylene glycol，PEG）等合成分子在内的多种功能分子得以偶联到外泌体表面，大大拓宽了应用范畴。

在循环时间调控方面，研究人员较早采用脂质后插入（post-insertion）这一生物物理策略对外泌体进行 PEG 化修饰。先将靶向表皮生长因子受体（epidermal growth factor receptor，EGFR）的纳米抗体偶联至磷脂-PEG 衍生物，制成纳米抗体-PEG 微胶束；与外泌体共孵育后，纳米抗体-PEG-脂质以温度依赖方式自发插入外泌体膜。该修饰未改变外泌体的形态、粒径与蛋白组成，而 PEG 的空间屏蔽作用减少了外泌体与细胞的非特异性相互作用，并显著延长其体内循环时间——未经修饰的外泌体在小鼠静脉注射后约 10 min 内即被快速清除，而经纳米抗体-PEG-脂质修饰的外泌体在注射后 60 min 以上仍可在血浆中检出，循环时间约为未修饰组的 6 倍[51]。

在医学影像领域，采用化学修饰把双功能螯合剂连接到外泌体表面，再标记上同位素^{64}Cu，之后通过正电子发射断层扫描成像，清晰地显示了外泌体在小鼠体内实时、定量的精确示踪，观察其于肿瘤部位的富集现象[52]；在制药领域，一般传统的化疗药物会被包裹在内部，而化学修饰允许药物（或其前药）直接连接到外泌体的表面。研究人员利用点击化学将神经胶质瘤靶向肽结合在外泌体表面，并装载化疗药物姜黄素（curcumin），点击化学的高效性保证了靶向头部的精确展示，从而实现了药物穿过血脑屏障的精准递送[53]。另有研究者[54]采用化学手段将超顺磁性氧化铁纳米粒子（superparamagnetic iron oxide nanoparticles，SPIONs）偶联到血液来源的外泌体表面。这种磁性外泌体不仅保留了生物活性，还能在外部磁场的引导下，定向移动至肿瘤部位，实现磁靶向给药。

点击化学（click chemistry）是一种高效且具有特异性的生物正交反应，研究者[11]通过代谢工程在外泌体表面接入反应基团（如叠氮化物），然后利用点击化学反应连接功能分子。该策略的核心是引入非天然的化学基团，在不干扰内源性生物分子活性的前提下，实现外泌体表面的定向功能化。

表 2 膜蛋白修饰领域基因工程与化学修饰的特性与运用对比

Table 2 Comparison of characteristics and applications between genetic engineering and chemical modification in the field of membrane protein modification

特性	基因工程	化学修饰
修饰性质	内源性修饰	外源性修饰
作用对象	供体细胞	纯化的外泌体
操作时机	分泌前	分泌后
优点	保持天然构象，生物活性高，结合稳定	操作简单快速，不受细胞类型限制，不仅限于蛋白（可连接聚合物、小分子）
缺点	耗时，转染效率难控制，可能影响细胞生理状态	可能影响外泌体膜的流动性或掩盖膜蛋白；化学试剂可能有毒性残留

铜催化的叠氮-炔基环加成反应是点击化学用于化学修饰的最早形式，Smyth 等[50]早期利用该技术成功连接了小分子荧光探针，但由于铜离子具有细胞毒性及潜在的膜损伤风险，目前在活体应用（如长循环 PEG 化修饰）中受到限制，更多被无铜点击化学所取代。

应变促进的叠氮-炔基环加成反应是无铜点击化学领域应用最广的技术。在具体技术执行层面，基于代谢糖工程（metabolic glycoengineering）的标记法是这一策略较为经典的路径。研究人员[55-56]利用细胞天然的糖代谢通路，将含有叠氮基团的非天然糖代谢前体（如四乙酰化 N-叠氮基甘露糖胺）与间充质干细胞共孵育。细胞的生物合成机器会将这些叠氮基团摄取并整合至新生外泌体膜表面的糖蛋白或糖脂中，从而生成叠氮化的外泌体。随后，通过 DBCO-azide 无铜点击化学将 c（RGDyK）肽高效偶联至外泌体表面，实现了在静脉给药后靶向缺血性大脑的病变区域[57]。

2.3　膜融合技术与杂合外泌体的诞生

膜融合技术（membrane fusion）是近些年来新兴的物理化学修饰策略，旨在构建兼具外泌体生物学活性与脂质体工程学可控性的“杂合外泌体”。这种策略的核心是利用物理（如冻融、挤压）或化学方法，打破外泌体和脂质体的脂质双分子层的界限，将二者重新组装，形成兼具二者成分的“外泌体-脂质体杂合纳米囊泡”[58]。

Sato 等[20]首创了基于冻融循环的膜融合体系，通过物理手段诱导外泌体与合成脂质体的脂质双分子层发生重组与混合。相较于传统的化学融合剂或电穿孔手段，冻融法不仅操作简便，更能有效避免化学试剂残留对膜蛋白天然构象与功能的潜在损害。膜融合技术展现出了与基因工程策略的高度协同性。研究[20]证实，经基因工程改造过表达人类表皮生长因子受体 2（human epidermal growth factor receptor 2，HER2）受体的外泌体，在经历多次冻融循环并与脂质体融合后，其膜表面的 HER2 蛋白及其酪氨酸磷酸化活性仍能得到保留。这一发现表明，研究者[12,59]可以先通过上游的基因工程赋予外泌体特定的生物学配体，再通过下游的膜融合技术引入外源脂质，从而构建出“蛋白-脂质双重工程化”的智能递送载体。

更具工程化潜力的是，引入带有不同电荷的脂质体，可以大幅调节杂合外泌体与受体细胞的相互作用[20]。利用 PEG 修饰的脂质体与外泌体融合构建的杂合囊泡，使得其在 HeLa 细胞中的摄取效率相较于天然外泌体提升近两倍，在特定条件下，阳离子脂质（如 1，2-二油酰基-3-三甲基铵丙烷）的引入反而降低了细胞摄取，也说明了脂质组分对胞吞途径的复杂调控功能[20]。

3　从被动装载到智能可控主动装载的装载技术跃迁

外泌体作为一种天然的纳米递送载体，本身天然携带的生物信息通常不具备特定的治疗功能。如何将治疗性蛋白高效安全、稳定可控地装载到外泌体中，目前的装载策略在方法上呈现出两种截然不同的路径，本文根据装载发生的时间节点与操作对象的不同，将其系统地划分为两大类：外源性装载策略与内源性装载策略[11]。

外源性装载，亦称提取后装载，将纯化后的外泌体视为独立的药物容器。该策略主要通过物理或化学手段直接处理外泌体与药物的混合物。从基础的利用浓度梯度进行的被动扩散[60-61]，到利用电穿孔[24]、超声[62]、冻融[63]等手段破坏膜结构实现的物理主动装载，再到利用皂苷等试剂进行的化学渗透[64-65]，这些方法通常具有操作简便、适用范围广的特点[66]（图 4）。然而，如何在提高装载效率的同时，最大限度地减少对外泌体膜完整性的破坏及囊泡的聚集，是该类策略面临的主要挑战[67-68]。

内源性装载，亦称提取前装载，聚焦于外泌体的

生物发生源头，通过基因工程等手段改造亲本细胞（parental cells）。该策略利用细胞天然的生物合成与分选机制[5, 69]，在细胞生成外泌体的过程中将药物自动获取并包装入囊泡[22]（图 4）。除了传统的过表达策略外，近年来涌现了 RBPs 的特定序列识别技术[15, 70]和基于模块化蛋白工程的设计[12-13]，实现了货物的定向富集。

为了解决持续表达可能带来的细胞毒性及装载量不可控的问题，融合了合成生物学理念的诱导型动态装载系统（inducible dynamic loading systems）被成功开发[11]，例如利用光控和化学诱导系统不仅实现了药物装载量的理性设计[71-72]（图 4），还对药物的“时空可控性”进行精密设计，标志着外泌体工程化载药策略从“随机被动装载”迈向“可控的主动装载”的新阶段。

3.1 内容物的外源性装载策略

3.1.1 基于被动扩散与理化作用的装载 作为外泌体药物装载中最基础且广泛应用的策略，基于被动扩散与理化作用的方法主要依赖于浓度梯度驱动（或分子间的非共价相互作用）。这类策略具有操作简便、最大限度保留外泌体膜完整性及生物学活性的优势，特别适用于小分子疏水药物及特定表面修饰的生物大分子。

共孵育法（co-incubation）是现有最为简便的药物装载手段，其核心机制是利用药物在溶液和外泌体膜两者之间的浓度梯度差，驱动药物分子跨过脂质双分子层被动扩散进入外泌体腔内。由于外泌体膜脂质丰富，该方法针对疏水性小分子药物（如姜黄素、紫杉醇、阿霉素等）表现出天然的亲和力及较高装载效率[60,62]。共孵育法的局限性是对亲水性大分子的装载效率极低[63]，并且载药量严格受限于药物的油水分配系数以及外泌体的膜流动性，所以往往都要较长的孵育时间，这有可能造成部分外泌体在操作时发生聚集或降解的情况[73-74]。

为了克服单纯被动扩散所产生的局限，疏水插入策略（hydrophobic insertion）把“膜锚定”概念引入进来，利用疏水性基团（如胆固醇、磷脂或脂肪酸链）跟功能性分子的共价偶联，使其凭借疏水作用自动嵌入到外泌体的脂质双分子层当中。新近研究[75]表明，将 siRNA 与胆固醇部分进行化学偶联，可以有力促进核酸药物在外泌体膜表面的稳定锚定，甚至部分插入膜的内侧。

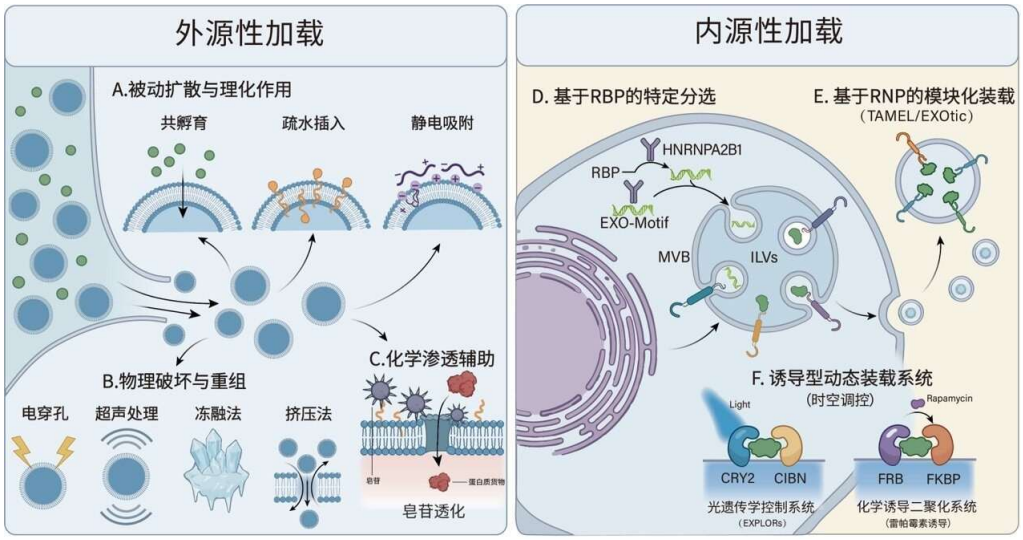


图 4 外泌体外源性装载与内源性装载策略示意图。RBP：RNA 结合蛋白；MVB：多囊体；ILVs：腔内小泡；RNP：核糖核蛋白复合物；TAMEL：靶向模块化细胞外囊泡装载技术。

Figure 4 Schematic diagram of exogenous and endogenous loading strategies for exosomes. RBP: RNA-binding protein; MVB: multivesicular body; ILVs: intraluminal vesicles; RNP: ribonucleoprotein; TAMEL: targeted and modular EV loading.

静电吸附法(electrostatic adsorption)是一种基于电荷相互作用的表面装载策略。天然外泌体表面由于富含大量的唾液酸(sialic acid)和磷脂酰丝氨酸(phosphatidylserine),而呈现明显的负电位(Zeta电位通常为负值)[76]。利用这一特性,带有正电荷的阳离子聚合物(如鱼精蛋白、阳离子脂质体等)或经阳离子化修饰的药物分子,能够通过静电引力吸附覆盖在外泌体表面,形成一层“电荷冠”。

3.1.2　基于物理破坏与重组的装载策略　物理破坏与重组策略代表了一类通过施加外部物理能量来克服脂质双分子层屏障的主动装载技术。其核心逻辑在于利用物理手段诱导外泌体膜产生瞬时的可逆性孔隙(transient permeabilization),从而使处于周围环境中的亲水性药物、生物大分子等能够顺着浓度梯度进入外泌体腔内,随后通过膜的自组装特性恢复其完整性[63]。相比于被动扩散,这类方法通常能显著提高对亲水性分子和核酸类药物的装载效率。

电穿孔(electroporation)是目前应用最为成熟的核酸药物装载手段,尤其在 siRNA 和微小 RNA(microRNA,miRNA)的递送研究中占据主导地位。该技术通过施加短频的高压电脉冲,在外泌体的磷脂双分子层上形成纳米级的亲水性孔道,使带负电荷的核酸分子在电场驱动下穿越膜屏障进入腔内[24]。尽管电穿孔能够实现较高的装载效率,但其剧烈的电化学环境常导致核酸分子发生严重的聚集甚至沉淀,且可能改变外泌体的 Zeta 电位和胶体稳定性。近期的优化策略指出,通过在电穿孔缓冲液中添加海藻糖[68]或柠檬酸盐[77],可以有效维持外泌体的结构稳定性并减少 siRNA 的聚集沉淀,从而提升功能性货物的使用率[78]。

超声处理(sonication)利用超声波产生的空化效应和机械剪切力来暂时破坏外泌体膜的完整性。这种剧烈的机械扰动能够迫使药物分子进入外泌体内部,尤其适用于紫杉醇等具有一定体积的药物装载[79]。对比研究指出,在这一种类内容物的载药策略比较中,超声法往往能获得优于电穿孔和共孵育的装载效率,但其高能输入也可能导致外泌体膜发生不可逆形变,引发膜表面功能蛋白的变性或脱落,削弱了外泌体的免疫逃逸能力和靶向归巢功能[80]。因此,严格控制超声的功率、周期以及低温操作环境是该方法成功的关键[81]。

冻融法(freeze-thaw)提供了一种相对温和的装载替代方案。该方法通过反复的冷冻(通常在液氮或-80℃)与室温解冻循环,利用冰晶的形成与重结晶过程刺破脂质膜,同时伴随急剧的渗透压变化诱导膜发生瞬时融合,从而将药物封装入内。冻融法特别适用于蛋白质、多肽及亲水性小分子的装载,且常被用于构建综合了外泌体与脂质体特性优势的“杂合外泌体”[20]。尽管其操作简单且不涉及外源化学试剂,但冻融循环的效率通常低于超声法[82],且多次循环可能导致外泌体粒径分布变宽[83]。

挤压法(extrusion)通过反复推挤外泌体与药物的混合物,使其通过孔径小于外泌体直径的聚碳酸酯滤膜[84]。在剧烈的机械挤压作用下,外泌体膜发生破裂并随即发生重组,在此过程中将药物被动包裹入囊泡腔内。值得注意的是,挤压法不仅用于药物装载,更是制备“外泌体模拟物”(exosome mimetics)的核心技术——即直接将供体细胞挤压成纳米囊泡[85-86]。这种方法能大幅提高囊泡的产量和均一性,但强制的重组过程可能会丢失部分膜表面不对称性及特定的脂质筏结构[87]。

3.1.3　化学渗透辅助(chemical permeabilization)　化学渗透辅助技术利用化学试剂瞬时改变膜的理化性质,实现药物装载。在这一类别中,表面活性剂辅助法(surfactant-assisted),特别是利用皂苷(saponin)进行膜打孔,已成为实现大分子亲水性药物(尤其是治疗性蛋白和酶)高效装载的金标准策略[64, 88]。皂苷是一类天然存在的非离子型表面活性剂,其独特的分子结构赋予了其对外泌体膜成分的高度选择性识别能力[89-90]。在共孵育过程中,皂苷分子能够插入脂质膜并与胆固醇形成不溶性的复合物,导致膜结构中胆固醇的侧向分布发生重排[91],进而诱导膜表面形成二维六角形的孔隙结构[92]。这些瞬时形成的微孔通道并未破坏整个囊泡的完整性,但足以显著增加膜的通透性[89, 93],使得外界高浓度的亲水性大分子〔如过氧化氢酶、大分子多肽[94]或规律成簇间隔短回文重复(clustered regularly interspaced short palindromic repeat,CRISPR)/CRISPR 相关蛋白

核酸酶 9(CRISPR associated nuclease 9,Cas 9)核糖核蛋白复合物[95]]能够顺着浓度梯度穿越疏水屏障进入外泌体腔内。

相比之下,皂苷处理条件温和,不涉及剧烈的温度变化或能量输入,因此能够最大限度地保留被装载蛋白的天然构象和生物学活性[93]。例如,在帕金森病模型的治疗研究中,利用皂苷装载过氧化氢酶的外泌体,其酶活性保留率显著高于超声组和冻融组,且装载效率可达被动孵育组的数百倍[63]。然而,皂苷本身具有溶血活性,且残留的皂苷可能对受体细胞产生细胞毒性[96]。因此,该策略在临床转化中的关键质控点在于装载后的纯化工艺,必须确保通过超速离心或排阻色谱彻底去除游离的皂苷分子[97-98]。表 3 按类别区分,对外源性装载各种常见策略进行了机制与适用范围的鉴别[59,63,99-110]。

3.2 内容物的内源性装载策略

3.2.1 基于 RNA 结合蛋白的特定分选

在外泌体核酸药物递送领域,提高特定 RNA 分子在囊泡中的富集度一直是个难题。研究[111]发现,细胞内存在一套精密的序列编码系统,即特定的 RBPs。这种蛋白能够识别 RNA 序列上的特定基序(EXO-Motifs),并将这些 RNA 定向转运至外泌体内部。基于这一生物学原理,利用 RBP 进行定向分选已成为内源性装载的先进策略。

异质核糖核蛋白 A2B1(heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A2B1,hnRNPA2B1)是目前研究较为透彻的外泌体分选协同蛋白。Villarroya-Beltri 等[112]的开创性研究发现,hnRNPA2B1 能够特异性识别某些 miRNA(如 miR-198)序列中的 GGAG 基序,而 hnRNPA2B1 本身的核转运又依赖其苏摩化(sumoylation)修饰,所以这种修饰充当了其进入外泌体的身份证明。借鉴这一机制,研究人员通过在治疗性 mRNA 和 siRNA 的 3’非翻译区(3’untranslated region,3’UTR)等位置,利用基因工程手段插入高亲和力的 EXO-Motif 序列,成功实现了外源基因药物在胞内的协同式分选,提高了其在外泌体中的丰度[113-114]。

表 3 常见外源性装载策略的机制与应用对比

Table 3 Comparison of mechanisms and applications of exogenous loading strategies

策略类别	具体方法	核心机制	适用范围	优势与局限	相关文献
被动扩散与理化作用	共孵育法	浓度梯度驱动,药物被动扩散或插入脂质双层	疏水性小分子(如姜黄素、紫杉醇、阿霉素)	优势:操作简单,保持囊泡完整性;局限:亲水大分子运输效率极低,耗时长,易引起聚集	[99-102]
	疏水插入策略	膜锚定;利用胆固醇/脂质共价偶联物自发嵌入双分子层	siRNA 等核酸的偶联物,膜表面功能化分子	优势:促进核酸稳定锚定,调节膜融合特性;局限:定位于膜上而非完全封装于腔内	[59,103-104]
	静电吸附法	表面电荷相互作用;利用外泌体负电位吸附阳离子聚合物/药物	带正电荷的聚合物、修饰后的药物复合体	优势:形成稳定“电荷冠”,可逃避清除,赋予靶向能力;局限:表面修饰可能掩盖天然受体,影响原有靶向性	[105]
物理破坏与重组	电穿孔	高压电脉冲诱导双分子层产生瞬时纳米孔道	siRNA、miRNA 等核酸药物	优势:核酸装载的金标准,装载效率高;局限:易导致核酸沉淀聚集,改变 Zeta 电位(需加海藻糖等优化)	[106]
	超声处理	空化效应与机械剪切力破坏膜完整性后重组	较大体积药物(紫杉醇)、酶类	优势:载药量通常优于共孵育和电穿孔;局限:高能输入易致膜不可逆形变及表面蛋白脱落	[107]
	冻融法	冰晶形成与重结晶刺破膜,渗透压变化诱导融合	蛋白质、多肽、亲水性小分子(杂合外泌体)	优势:条件温和,无化学试剂,适合构建脂质体-外泌体杂合物;局限:效率低于超声法,多次循环易致粒径变宽或聚集	[107-108]
	挤压法	机械剪切力迫使混合物通过特定孔径滤膜破裂重组	小分子、构建“外泌体模拟物”	优势:囊泡产量大,粒径均一性好;局限:丢失膜不对称性及部分脂质筏结构	[109]
化学渗透辅助	表面活性剂/皂苷辅助	皂苷与膜内胆固醇结合,形成瞬时二维六角形微孔	治疗性蛋白、酶(过氧化氢酶)、CRISPR-Cas9 复合物	优势:大分子亲水药物高效装载金标准,最大程度保留蛋白构象/活性;局限:皂苷具溶血毒性,需极严格的纯化工序	[63,110]

CRISPR:规律成簇间隔短回文重复;Cas 9:CRISPR 相关蛋白核酸酶 9。

CRISPR: clustered regularly interspaced short palindromic repeat; Cas 9: CRISPR associated nuclease 9.

除了 hnRNPA2B1，Y 框结合蛋白 1（Y-box binding protein-1，YBX1）也是介导 RNA 分选的关键角色。与 hnRNPA2B1 不同，YBX1 主要通过识别 RNA 的二级结构或其他特定序列（如 tRNA 片段或 Y RNA）来介导其分泌[115]。研究[116]表明，YBX1 在外泌体分选过程中可能与液-液相分离（liquid-liquid phase separation，LLPS）机制有关，并通过在细胞质中形成凝聚体，从而将特定的非编码 RNA 招募并包裹进新生的外泌体中。

此外，诸如突触结合蛋白结合胞质 RNA 相互作用蛋白 SYNCRIP（可识别 hEXO 的 GGCU 基序[117]）、主要穹窿蛋白（major vault protein，MVP）[118]等 RBPs 也相继被开发为分选工具。这些利用 RBPs 特性的工程化策略，不仅实现了线性 RNA 的装载，也被成功应用于环状 RNA 的主动富集。

3.2.2　基于人工构建的 RNP 复合体的靶向模块化装载　为进一步突破天然 RBP 分选效率低的瓶颈，实现对更多特定 RNA 序列的强制富集，研究人员利用高亲和力的异源核糖核蛋白复合体（ribonucleoprotein，RNP）——一种由 RNA 和蛋白质结合形成的功能复合体——构建了人工分选系统[119]。此策略的核心逻辑在于将具有高度特异性识别能力的病毒或古细菌来源的蛋白结构域融合至外泌体支架蛋白的胞质侧，主动捕捉带有特定识别基序的工程化 RNA 货物，从而将其拖入外泌体中[14,120]。

Hung 和 Leonard[121]率先提出了靶向模块化细胞外囊泡装载技术（targeted and modular EV loading，TAMEL）的通用型装载平台。该系统利用了噬菌体 MS2 衣壳蛋白与其同源 RNA 茎环结构之间纳摩尔级的高亲和力[122]。在设计上，研究团队将 MS2 蛋白融合至外泌体膜蛋白 Lamp2b 的胞质尾区，同时在目标 RNA 序列中引入 MS2 特异性结合位点。实验数据[121]表明，这种主动招募机制能够有效克服胞质内其他 RBPs 的竞争，使得目的 RNA 在外泌体中的富集度相较于被动过表达对照组提高了 6～40 倍，确立了模块化 RNP 装载的可行性。

在前人研究基础上，Kojima 等[15]开发了更为精密且集成化的 EXOtic 系统，将外泌体内源性装载技术推向了新的高度。该系统核心组件采用了古细菌核糖体蛋白 L7Ae，它能够以极高的特异性和亲和力结合 RNA 分子上的 C/D box 基序（一种特定的 Kink-turn 结构）[123]。为了实现高效的腔内富集，研究人员将 L7Ae 融合于四跨膜蛋白 CD63 的 C 端，构建出一种向内部摄取的分子装置。当供体细胞表达具有 C/D box 结构的治疗性 mRNA 时，CD63-L7Ae 融合蛋白能够将其强力招募并锁定在外泌体内部。在帕金森病小鼠模型的治疗研究[15]中，该系统成功实现了过氧化氢酶 mRNA 向脑内神经元的定向递送，显著降低了神经炎症水平。与被动装载相比，EXOtic 系统不仅大幅提高了治疗性 mRNA 的拷贝数，还有效减少了非特异性细胞杂质 RNA 的干扰，提升了递送系统的纯度与效能。

然而，基于高亲和力 RNP 的装载策略也面临着释放困难的挑战，这类策略装载时所需的强结合力可能成为货物在受体细胞内释放的阻碍[124]。由于 L7Ae 与 C/D box 之间的解离常数（K_d）极低，这种过于紧密的结合可能导致 mRNA 在进入靶细胞胞质后仍被锚定在外泌体膜碎片或支架蛋白上，导致无法被核糖体有效识别和翻译[125-127]。后续的研究尝试在支架蛋白与 L7Ae 之间加入 pH 敏感的连接肽，在到达特定位置、特定酸碱环境后连接部断裂实现分离。

3.2.3　病毒融合蛋白介导的主动装载与胞质递送：水疱性口炎病毒糖蛋白（vesicular stomatitis virus glycoprotein，VSV-G）　VSV-G 作为一种经典的病毒包膜蛋白，因其卓越的膜融合活性与泛嗜性，被开拓性运用于外泌体工程化的功能组件[128-129]。

VSV-G 在内容物装载方面展现出独特的分子招募机制，传统观点认为病毒蛋白主要负责侵染，但 Meyer 等[128]的研究揭示，VSV-G 能够利用自身的跨膜域和胞内域，将与之融合的靶蛋白通过假型化途径共转运至出芽的外泌体中。颇为反常的是，这

种分选并不完全依赖于 VSV-G 庞大的胞外域，这意味着可以通过截短修饰来构建更紧凑的载药结构[130-131]。基于这一机制，近期的研究进一步拓展了其应用范围。例如，通过将 Cas9 蛋白或特定的转录因子与 VSV-G 融合，供体细胞在产生外泌体时便会将这些难以自然分选的大分子高丰度地富集到囊泡内部[14, 132-133]。相较于单纯的被动过表达，VSV-G 介导的主动装载策略显著提升了单位囊泡内的有效药物载量，为实现低剂量给药下的高治疗指数奠定了物质基础[134]。

VSV-G 在外泌体工程中最具革命性的贡献莫过于其介导的内体逃逸功能（endosomal escape）。通常来说，外泌体通过内吞作用进入受体细胞后，通常会被截留在早期内体和晚期内体中，最终随内体成熟进入溶酶体被降解，导致绝大部分药物在发挥作用前即失效[135-136]。而 VSV-G 具有显著依赖的膜融合活性：在低 pH（<6.2 ~ 6.4）条件下发生构象改变，暴露出疏水性的融合肽，诱导外泌体膜与内体膜发生融合[137-138]。这一过程直接打通了囊泡腔与受体细胞胞质之间的物理通道，以膜融合的方式将 RNP、mRNA 或治疗性蛋白直接释放到细胞质中，从而有效规避了溶酶体的降解途径[139]。

3.2.4 诱导型动态装载系统 诱导型动态装载系统（inducible dynamic loading systems）通过引入外源性刺激（如光照或小分子药物）来控制蛋白质之间的相互作用，从而赋予递送系统前所未有的时空可控性（spatiotemporal control）。这使得研究人员不仅能够精确调控货物装载的启动与终止，还能通过调节刺激强度来定量控制外泌体内的载药丰度。

在这一前沿领域中，光遗传学控制系统（optogenetic systems）以其非侵入性、可逆性与极高的操作精度成为研究热点。较具代表性且完善的是由 Yim 等[71]开发并经后续研究者不断优化的 EXPLORs（exosomes for protein loading via optically reversible protein-protein interactions）技术。该技术的分子机制基于植物拟南芥中的隐花色素 2（cryptochrome, CRY2）与其互作配体 CIBN 之间的蓝光依赖性相互作用[140]。实验过程中，研究人员通常将 CIBN 融合在 CD63 的外泌体膜表面，充当膜上的锚点；而治疗性的货物蛋白则与 CRY2 融合，游离于细胞质中。当对供体细胞施加蓝光（波长 460 nm）照射时，CRY2 发生构象改变[141]并与膜上的 CIBN 紧密结合，从而将货物蛋白牢牢绑定。一旦外泌体被受体细胞摄取后进入体内无光环境，CRY2 与 CIBN 会自发解离，促使货物蛋白从膜支架上脱落并释放至胞质中[71]。这种“光控装载-暗处释放”的特性完美解决了传统融合蛋白难以从外泌体膜上解离的难题，极大地提高了胞内活性蛋白（如转录因子、超阻遏蛋白或基因编辑酶）的生物利用度。

与光控策略相辅相成，化学诱导二聚化（chemically induced dimerization, CID）系统则利用小分子药物作为“分子胶水”，通过诱导两个蛋白结构域结合来实现货物的动态装载。由于部分常用诱导剂本身已获临床批准，该策略在临床转化上具有一定便利性。其中，雷帕霉素（rapamycin）诱导的 FRB/FKBP 系统是应用最为广泛的范例：雷帕霉素先结合 FKBP12，所形成的 FKBP12-雷帕霉素复合物再以高亲和力结合 mTOR 的 FRB 结构域，三者构成稳定的三元复合物。基于这一可诱导组装的原理，已有研究[142]将 Cas9 拆分为两段、分别融合 FRB 与 FKBP 结构域，在雷帕霉素存在下可控地重新组装以实现可诱导的基因编辑。

将该原理移植到外泌体工程化改造中，可将其中一个二聚化结构域锚定于外泌体膜分选蛋白，另一结构域与目标货物融合；加入诱导剂后，胞质中的“货物-结构域”融合蛋白被招募至膜上的锚定结构域，从而在囊泡发生过程中被高效包装。

Osteikoetxea 等系统比较了化学诱导（FKBP-FRB）与光诱导（如 Cryptochrome 2 等）等多种可逆异二聚化系统对 Cas9 的装载，证实此类策略可将 Cas9 有效载入外泌体。其中光诱导系统因其可逆性，有助于货物在受体细胞内释放，使外泌体成为递送 CRISPR/Cas9 核糖核蛋白等大分子复合物的有力工具[143]。

4　靶向递送系统与临床应用实例

4.1　组织工程与生物材料协同：长效修复局部微环境

在绝大多数的组织工程应用中，单纯依赖静脉注射外泌体往往面临在体内快速清除的问题，极大地限制了其在损伤部位的有效驻留与持续修复能力[144]。为了克服这一药代动力学障碍，将工程化外泌体与仿生生物材料（如可注射水凝胶、3D 打印脱细胞支架）相结合，成为长效修复局部微环境的创新策略[145-146]。

作为一种高生物相容性的内源性纳米载体，外泌体完美弥补了单纯高分子材料缺乏生物活性的短板。从微观机制来看，研究者往往通过物理包埋或温和的化学交联技术（如利用席夫碱反应[105,147-148]或光交联[149-150]），将搭载有促血管生成因子或成骨 miRNA 的工程化外泌体锚定在水凝胶的三维网络内部。当这种复合支架被植入骨缺损或真皮层的复杂创面时，水凝胶不仅提供了物理支撑基质，更充当了缓释屏障。随着支架材料在体内的缓慢降解，内部封闭的外泌体得以按空间和时间一定梯度进行可控释放[151-153]。这种缓释系统在损伤局部建立起了一个持久且高浓度的趋化因子梯度，持续招募周围的内源性干细胞与内皮祖细胞向缺损区迁移，从而显著加速血管新生与组织原位再生[154-155]。

4.2　损伤微环境的免疫重塑：从急剧炎症到组织再生的枢纽

组织损伤（如急性心肌梗死、严重脊髓损伤或大面积烧伤）发生后，局部微环境往往会迅速陷入严重的炎症失调状态。这种由先天免疫系统主导的过度炎症反应若不加干预，将导致广泛的细胞凋亡和不可逆的纤维化瘢痕形成[156]。在此背景下，工程化外泌体被设计为一种能够精准干预免疫网络、促进炎症消退并启动修复程序的免疫稳态调节剂[157]。

巨噬细胞在损伤后的组织修复过程中扮演着核心角色。在急性损伤期，巨噬细胞主要表现为促炎的 M1 表型，加剧组织破坏；而在增殖修复期，则需要其向抗炎与促修复的 M2 表型转化[158]。利用工程化外泌体进行巨噬细胞的极化重编程，是当前极具前景的干预策略。例如，通过在天然外泌体表面化学偶联或基因融合特定的靶向肽，可以使其精准寻迹并被受损组织浸润的 M1 型巨噬细胞高效内吞。一旦进入靶细胞胞质，外泌体释放其内部预先装载的抗炎核酸（如特定 miRNA 或 siRNA）[156]或抗氧化酶（如通过皂苷辅助法装载的过氧化氢酶）[63,159]。这些治疗性载荷能够精准阻断核因子 κB（nuclear factor κB，NF-κB）等促炎信号通路的激活[160-161]，或者直接中和局部的活性氧（reactive oxygen species，ROS），从而强制诱导促炎的 M1 型巨噬细胞向具有组织修复功能的 M2 型极化。这种免疫重塑不仅有效预防了二次炎症级联损伤，更通过分泌转化生长因子-β（transforming growth factor-β，TGF-β）和 IL-10 等修复因子诱导局部免疫耐受[162]，为后续的血管生成、细胞外基质沉积与组织功能重建扫清了微环境障碍。

4.3　干细胞归巢与细胞命运的基因表达重编程

在干细胞与发育再生领域，工程化外泌体通过表面展示特异性归巢肽，实现了对靶细胞的主动搜寻。例如，狂犬病毒糖蛋白衍生肽 RVG-29 修饰的外泌体能够特异性结合神经元及靶细胞表面的烟碱型乙酰胆碱受体（nicotinic acetylcholine receptor，nAChR）[163-165]。

当装载具有神经保护功能的 miR-124 时，其治疗的核心机制更为复杂，转为对细胞命运的基因表达重编程[166]。作为一种神经元特异性的 miRNA，miR-124 进入神经干细胞后，通过靶向 REST 复合体磷酸酶组分小 C 端结构域磷酸酶 1（small CTD phosphatase 1，SCP1）的 3’ UTR，间接拮抗 RE1 沉默转录因子（RE1-silencing transcription factor，REST）抑制通路，介导其降解或翻译抑制[167-168]。从分子通路来看，miR-124 通过下调 SRY 盒转录因子 9（SRY-box transcription factor 9，Sox9）和多聚嘧啶区

结合蛋白 1(Polypyrimidine tract-binding protein 1, Ptbp1)促进神经分化,上调微管相关蛋白 2(microtubule-associated protein 2, MAP2)和神经元特异性核蛋白 NeuN 等神经元标志物的表达[169],同时间接激活了经典 Wnt 信号通路,促进 β-catenin 入核,并启动神经元存活与突触生长相关基因的表达[170-171]。这种基于基因调控网络的干预,能够有效诱导损伤部位的神经干细胞向功能性神经元分化,而非形成阻碍修复的胶质瘢痕[172]。这种精确靶向机制显著优化了治疗指数,有效规避了非特异性分化带来的组织畸变风险。

4.4 突破生理屏障的器官精准修复:以急性肾损伤为例

器官层面的组织修复常受限于复杂的生理屏障,导致药物难以在损伤部位有效富集。例如,在急性肾损伤和慢性肾病的模型中,游离的药物极易被肝脏清除,且难以特异性地富集于受损的肾小管上皮细胞[173-174]。工程化外泌体凭借其纳米级尺寸与可定制的表面特性,为突破这些生理屏障提供了理想方案。

实验[175-176]证明,利用特定靶向肽如肾脏靶向肽(kidney-targeting peptide, KTP)修饰的工程化外泌体或仿生囊泡,在静脉注射下表现出极其显著的肾脏趋向性。从微观过程看,研究者使用一种序列为 CSAVPLC 的 KTP,其可以通过膜融合机制促进肾细胞的摄取。另外,当靶向性的外泌体内部装载有修复性核酸 miR-26a 时,其核心治疗机制将发生质的飞跃。miR-26a 在细胞质中释放后,能够直接结合并靶向结缔组织生长因子(connective tissue growth factor, CTGF) mRNA 的 3' UTR 区[177-178],阻断 SMAD3 及 TGF-β 促纤维化信号通路的过度激活,从而显著抑制肾纤维化的病理进程[179]。研究[180-181]证实,该策略在动物模型中不仅显著降低了血清肌酐与尿素氮水平,还通过下调 NF-κB 通路有效减轻了局部的氧化应激损伤与细胞凋亡,实现了对受损肾脏组织的高效功能重塑。

4.5 退行性疾病的干预与抗衰老探索

针对年龄相关的退行性疾病,外泌体疗法在延缓组织衰老、逆转基质退行性病变方面展现出独特的治疗潜能[182]。以骨关节炎这一典型的退行性疾病为例,E7 肽修饰的工程化外泌体能够精准靶向并结合体内的间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSCs)[183],通过装载成软骨诱导剂(如小分子 kartogenin)或软骨保护性 miRNA,实现对内源性干细胞分化方向及基质代谢的精准调控[183-184]。

以装载 miR-140 的外泌体为例,其在进入关节腔内的 MSCs 后,能够通过靶向血小板结合蛋白基序的金属蛋白酶-5(a disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs 5, ADAMTS-5),有效抑制其对细胞外基质的降解作用[185],在软骨组织中,miR-140 受 Sox9 转录调控[186],而 ADAMTS-5 正是其发挥生物学功能的主要靶标;此外,miR-140 还可通过抑制 RALA 间接上调 Sox9 蛋白水平[187],形成正反馈环路,强效促进软骨基质的合成。研究[188]表明,相比于游离药物,这种工程化递送策略大幅提升了药物在关节软骨缺损部位的滞留时间,有效诱导了内源性 MSCs 向软骨细胞的定向分化,拓宽了退行性疾病的治疗窗口。

5 人工智能辅助设计:深度学习赋能外泌体工程化的重构展望

如前文所述,当前使用的靶向配体多源于天然序列,且融合蛋白的构象及功能评估长期依赖传统的"试错性筛选"(trial-and-error screening)[189]。在极其复杂的体内损伤微环境(如心肌梗死后的蛋白酶富集区)或高分子水凝胶的动态降解过程中,这些天然组件面临亲和力受限[190]、易脱落和热力学性质不稳定的挑战[191]。为了进一步拓宽外泌体疗法的治疗窗口并实现对罕见干细胞亚群的精准定位,同时也为突破工程化外泌体量产规模化、标准化的瓶颈,整个工程化外泌体领域正寻求向"理性计算设计(computational design)"的根本性转变[192-193]。

随着结构生物学与人工智能的深度融合，近年来，以 AlphaFold2[16]、RoseTTAFold[17]、RFdiffusion[19]为代表的几何深度学习（geometric deep learning）工具的问世，正在系统性解决大分子融合蛋白的稳定性难题[18]，并为组织特异性超分子配体的从头设计注入全新动能[194-195]。

5.1　AlphaFold2 在融合蛋白构象预测与稳定性优化中的应用

在外泌体表面展示 scFv、酶或细胞因子等大分子蛋白时，研究者[13]常面临的核心挑战是融合蛋白的折叠错误与非特异性聚集，以及在体内循环过程中被蛋白酶快速降解。传统的工程化策略往往依赖经验法则，缺乏基于物理化学原理的结构依据。AlphaFold2及其衍生模型（如 AlphaFold-Multimer）的应用[16]，使得研究者能够以原子级精度预测支架蛋白与货物蛋白融合后的整体三维结构[191]。通过计算机模拟（in silico），可以直观评估融合操作是否破坏了支架蛋白的跨膜域拓扑结构，观察货物蛋白的活性中心是否因空间位阻而被遮蔽。

随着 AI 赋能微观分子结构稳定性评估的发展，AlphaFold2 输出的预测局部距离差异测试分数（predicted local distance difference test，pLDDT）和预测对齐误差（predicted aligned error，PAE）矩阵已成为评估工程化蛋白稳定性的金标准[196]。pLDDT 值较低的区域通常对应于蛋白质中的无序或高柔性区域，这些部位往往是血液中蛋白酶攻击的核心区[197-198]。基于 AI 辅助设计，研究者可以通过引入连接子来加固这些低 pLDDT 区域，从而显著提升融合蛋白在外泌体表面的热力学稳定性与半衰期[199]。

5.2　RFdiffusion：从头设计微型结合蛋白

在靶向配体的选择上，传统策略多局限于天然存在的蛋白（如 RVG 肽、天然抗体或受体配体），然而天然配体往往存在亲和力不足、组织特异性差或潜在的免疫原性问题。Baker 实验室开发的基于扩散模型生成的蛋白质设计模型——RFdiffusion[19]，该技术能够执行“功能基序骨架化（motif scaffolding）”任务，也就是将与靶受体结合的关键热点残基（hotspot residues）精准移植到一个全新的、结构紧凑且高度稳定的蛋白支架上[200]。这种方法使得设计专门适应外泌体表面微环境的微型结合蛋白（mini-binders）成为可能[201]。微型结合蛋白是一种通过计算设计手段，“人工合成”出的体积极小、稳定性极高且具有高亲和力的蛋白质片段，可被运用于工程化外泌体的配体设计方面。

近期已有研究团队[201]成功运用标准的“干湿闭环”完成了乳腺癌核心靶点 HER2 的高亲和力微型结合蛋白的从头设计。在该实际案例的“干实验”环节中，研究人员利用 RFdiffusion 生成靶向 HER2 结构域 IV 的蛋白骨架，并结合 ProteinMPNN 与AlphaFold2进行大规模虚拟筛选；在随后的“湿实验”验证中，依托大肠杆菌表面展示技术、流式细胞术及等温滴定量热法进行了精确的体外测定。通过这一闭环，最终筛选出的候选分子不仅实现了纳摩尔级别的高亲和力，且实现了分子体积的大幅度缩减。

5.3　智能化的“干湿闭环”研发全流程展望

结合上述 AI 工具，以 AI 智能设计驱动的“干湿闭环（dry-wet loop）”工程化外泌体设计蓝图已初具雏形。在“计算机模拟（in silico）”设计阶段，研究人员首先针对目标受体的三维结构特征，利用 RFdiffusion 等模型执行“从头设计”，生成具有高特异性空间构象的微型结合蛋白骨架，从而从源头上赋予配体强大的靶向结合潜力。随后，借由 ProteinMPNN 等工具优化氨基酸序列，以兼顾序列与三维结构的兼容性。在下一步中，引入 AlphaFold2 进行序列的盲测折叠预测，通过 pLDDT 和均方根误差（root mean square deviation，RMSD）等指标，精准剔除潜在的错误折叠物，预先评估结合配体与支架蛋白融合后的空间位阻与靶向亲和力。在“湿实验（wet-lab）”验证阶段，计算机筛选出的高评分候选序列通过高通量合成与表达，进入真实的生物学系统。纯化后的工程化外泌体将接受严谨的体外与体内功能学表征，以全面确证该递送系统的治疗潜力。

更为关键的是，这种“干湿闭环”具有高度的自我进化能力：湿实验中获取的真实数据（如表达丰度、实际亲和力和细胞学验证结果），最终会被整合为高质量数据集反馈给计算端，这种数据反哺机制将会使下一轮设计更加逼近真实的生物学规律。这一流程将原本需要数年才能完成的配体筛选与结构优化周期缩短至数周，极大地加速了工程化外泌体从基础设计走向临床转化的进程，为外泌体疗法注入了强大的新动能。

6 小结与展望

目前，工程化外泌体正处于生物医药创新的最前沿，它巧妙地融合了细胞生物学的天然智慧与合成生物学的理性设计。回顾技术演进，我们见证了从利用低丰度的 Lamp2b 到开发 PTGFRN/BASP1 等高密度、功能化支架蛋白的跃迁，这从根本上解决了外泌体表面展示效率低和载药量不足的瓶颈。在内容物装载方面，从简单的物理共孵育到基于EXOtic、TAMEL 等分子机器的主动分选系统，实现了核酸与蛋白药物的高效封装与胞内释放。而通过受体特异性内吞及胞内信号通路的精准阻断，工程化外泌体在肿瘤精准杀伤、免疫激活及组织再生、重塑肿瘤微环境等领域也展现了卓越的临床转化潜力，为复杂疾病的靶向治疗提供了从分子设计到临床应用的完整解决方案。

展望未来，AI 技术的深度介入将是该领域的最大变量。AlphaFold2 和 RFdiffusion 等工具的应用，意味着外泌体工程将不再局限于对天然部件的修饰，而是向着完全人造功能化的方向迈进。也许不久的未来，下一代工程化外泌体将拥有由 AI 设计的超稳定支架、皮摩尔级亲和力的从头设计配体，以及能响应特定病理微环境的智能释放开关。尽管在生产规模化、质量控制标准及监管政策上仍面临挑战，但工程化外泌体作为一种兼具天然生物学活性与人工设计精度的递送平台，必将给肿瘤、神经退行性疾病及基因治疗等领域带来革命性的突破，开启精准医疗的新篇章。

参考文献

1 Trounson A, McDonald C. Stem cell therapies in clinical trials: progress and challenges [J]. Cell Stem Cell, 2015, 17 (1): 11-22. doi: 10.1016/j.stem.2015.06.007.

2 Galipeau J, Sensebe L. Mesenchymal stromal cells: clinical challenges and therapeutic opportunities [J]. Cell Stem Cell, 2018, 22 (6): 824-833. doi: 10.1016/j.stem.2018.05.004.

3 Gnecchi M, He H, Liang OD, *et al.* Paracrine action accounts for marked protection of ischemic heart by Akt-modified mesenchymal stem cells [J]. Nat Med, 2005, 11(4): 367-368. doi: 10.1038/nm0405-367.

4 Lai RC, Arslan F, Lee MM, *et al.* Exosome secreted by MSC reduces myocardial ischemia/reperfusion injury [J]. Stem Cell Res, 2010, 4(3): 214-222. doi: 10.1016/j.scr.2009.12.003.

5 Kalluri R, LeBleu VS. The biology, function, and biomedical applications of exosomes [J]. Science, 2020, 367 (6478): eaau6977. doi: 10.1126/science.aau6977.

6 Mathieu M, Martin-Jaular L, Lavieu 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. doi: 10.1038/s41556-018-0250-9.

7 Saint-Pol J, Gosselet F, Duban-Deweer S, *et al.* Targeting and crossing the blood-brain barrier with extracellular vesicles [J]. Cells, 2020, 9 (4): 851. doi: 10.3390/cells9040851.

8 Wiklander OPB, Brennan MA, Lotvall J, *et al.* Advances in therapeutic applications of extracellular vesicles [J]. Sci Transl Med, 2019, 11 (492): eaav8521. doi: 10.1126/scitranslmed.aav8521.

9 Yanez-Mo M, Siljander PR, Andreu Z, *et al.* Biological properties of extracellular vesicles and their physiological functions [J]. J Extracell Vesicles, 2015, 4: 27066. doi: 10.3402/jev.v4.27066.

10 Wiklander OP, Nordin JZ, O'Loughlin A, *et al.* Extracellular vesicle *in vivo* biodistribution is determined by cell source, route of administration and targeting [J]. J Extracell Vesicles, 2015, 4: 26316. doi: 10.3402/jev.v4.26316.

11 Herrmann IK, Wood MJA, Fuhrmann G. Extracellular vesicles as a next-generation drug delivery platform [J]. Nat Nanotechnol, 2021, 16(7): 748-759. doi: 10.1038/s41565-021-00931-2.

12 Liang Y, Duan L, Lu J, *et al.* Engineering exosomes for targeted drug delivery [J]. Theranostics, 2021, 11(7): 3183-3195. doi: 10.7150/thno.52570.

13 Dooley K, McConnell RE, Xu K, *et al.* A versatile platform for generating engineered extracellular vesicles with defined therapeutic properties [J]. Mol Ther, 2021, 29(5): 1729-1743. doi: 10.1016/j.ymthe.2021.01.020.

14 Gee P, Lung MSY, Okuzaki Y, *et al.* Extracellular nanovesicles for packaging of CRISPR-Cas9 protein and sgRNA to induce therapeutic exon skipping [J]. Nat Commun, 2020, 11(1): 1334. doi: 10.1038/s41467-020-14957-y.

15 Kojima R, Bojar D, Rizzi G, *et al.* Designer exosomes produced by implanted cells intracerebrally deliver therapeutic cargo for Parkinson's disease treatment [J]. Nat Commun, 2018, 9(1): 1305. doi: 10.1038/s41467-018-03733-8.

16 Jumper J, Evans R, Pritzel A, *et al.* Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold [J]. Nature, 2021, 596(7873): 583-589. doi: 10.1038/s41586-021-03819-2.

17 Baek M, DiMaio F, Anishchenko I, *et al.* Accurate prediction of protein structures and interactions using a three-track neural network [J]. Science, 2021, 373(6557): 871-876. doi: 10.1126/science.abj8754.

18 Dauparas J, Anishchenko I, Bennett N, *et al.* Robust deep learning-based protein sequence design using ProteinMPNN [J]. Science, 2022, 378(6615): 49-56. doi: 10.1126/science.add2187.

19 Watson JL, Juergens D, Bennett NR, *et al.* *De novo* design of protein structure and function with RF diffusion [J]. Nature, 2023, 620(7976): 1089-1100. doi: 10.1038/s41586-023-06415-8.

20 Sato YT, Umezaki K, Sawada S, *et al.* Engineering hybrid exosomes by membrane fusion with liposomes [J]. Sci Rep, 2016, 6: 21933. doi: 10.1038/srep21933.

21 Xu M, Feng T, Liu B, *et al.* Engineered exosomes: desirable target-tracking characteristics for cerebrovascular and neurodegenerative disease therapies [J]. Theranostics, 2021, 11(18): 8926-8944. doi: 10.7150/thno.62330.

22 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. doi: 10.1038/s41580-020-0251-y.

23 Murphy DE, de Jong OG, Brouwer M, *et al.* Extracellular vesicle-based therapeutics: natural versus engineered targeting and trafficking [J]. Exp Mol Med, 2019, 51(3): 1-12. doi: 10.1038/s12276-019-0223-5.

24 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. doi: 10.1038/nbt.1807.

25 Stickney Z, Losacco J, McDevitt S, *et al.* Development of exosome surface display technology in living human cells [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2016, 472(1): 53-59. doi: 10.1016/j.bbrc.2016.02.058.

26 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. doi: 10.1016/j.biomaterials.2013.11.083.

27 Bai J, Duan J, Liu R, *et al.* Engineered targeting tLyp-1 exosomes as gene therapy vectors for efficient delivery of siRNA into lung cancer cells [J]. Asian J Pharm Sci, 2020, 15(4): 461-471. doi: 10.1016/j.ajps.2019.04.002.

28 Tran NH, Nguyen DD, Nguyen NM, *et al.* Dual-targeting exosomes for improved drug delivery in breast cancer [J]. Nanomedicine (Lond), 2023, 18(7): 599-611. doi: 10.2217/nnm-2022-0328.

29 Kim H, Yun N, Mun D, *et al.* Cardiac-specific delivery by cardiac tissue-targeting peptide-expressing exosomes [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2018, 499(4): 803-808. doi: 10.1016/j.bbrc.2018.03.227.

30 Liang Y, Xu X, Li X, *et al.* Chondrocyte-targeted microRNA delivery by engineered exosomes toward a cell-free osteoarthritis therapy [J]. ACS Appl Mater Interfaces, 2020, 12(33): 36938-36947. doi: 10.1021/acsami.0c10458.

31 Jiang J, Lu Y, Chu J, *et al.* Anti-EGFR ScFv functionalized exosomes delivering LPCAT1 specific siRNAs for inhibition of lung cancer brain metastases [J]. J Nanobiotechnology, 2024, 22(1): 159. doi: 10.1186/s12951-024-02414-7.

32 Liu X, Cao Z, Liu N, *et al.* Kill two birds with one stone: engineered exosome-mediated delivery of cholesterol modified YY1-siRNA enhances chemoradiotherapy sensitivity of glioblastoma [J]. Front Pharmacol, 2022, 13: 975291. doi: 10.3389/fphar.2022.975291.

33 Hung ME, Leonard JN. Stabilization of exosome-targeting peptides via engineered glycosylation [J]. J Biol Chem, 2015, 290(13): 8166-8172. doi: 10.1074/jbc.M114.621383.

34 Thery 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]. J Extracell Vesicles, 2018, 7(1): 1535750. doi: 10.1080/20013078.2018.1535750.

35 Andreu Z, Yanez-Mo M. Tetraspanins in extracellular vesicle formation and function [J]. Front Immunol, 2014, 5: 442. doi: 10.3389/fimmu.2014.00442.

36 Zimmerman B, Kelly B, McMillan BJ, *et al.* Crystal structure of a full-length human tetraspanin reveals a cholesterol-binding pocket [J]. Cell, 2016, 167(4): 1041-1051.e11. doi: 10.1016/j.cell.2016.09.056.

37 Reppert N, Lang T. A conserved sequence in the small intracellular loop of tetraspanins forms an M-shaped inter-helix turn [J]. Sci Rep, 2022, 12(1): 4494. doi: 10.1038/s41598-022-07243-y.

38 Zakeri B, Fierer JO, Celik E, *et al.* Peptide tag forming a rapid covalent bond to a protein, through engineering a bacterial adhesin [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2012, 109(12): E690-E697. doi: 10.1073/pnas.1115485109.

39 Alves NJ, Turner KB, Daniele MA, *et al.* Bacterial nanobioreactors--directing enzyme packaging into bacterial outer membrane vesicles [J]. ACS Appl Mater Interfaces, 2015, 7(44): 24963-24972. doi: 10.1021/acsami.5b08811.

40 Kowal J, Arras G, Colombo M, *et al.* Proteomic comparison defines novel markers to characterize heterogeneous populations of extracellular vesicle subtypes [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2016, 113(8): E968-E977. doi: 10.1073/pnas.1521230113.

41 Stipp CS, Kolesnikova TV, Hemler ME. EWI-2 is a major CD9 and CD81 partner and member of a novel Ig protein subfamily [J]. J Biol Chem, 2001, 276(44): 40545-40554. doi: 10.1074/jbc.M107338200.

42 Lewis ND, Sia CL, Kirwin K, *et al.* Exosome surface display of IL12 results in tumor-retained pharmacology with superior potency and limited systemic exposure compared with recombinant IL12 [J]. Mol Cancer Ther, 2021, 20(3): 523-534. doi: 10.1158/1535-7163.Mct-20-0484.

43 Toska E, Campbell HA, Shandilya J, *et al.* Repression of transcription by WT1-BASP1 requires the myristoylation of BASP1 and the PIP2-dependent recruitment of histone deacetylase [J]. Cell Rep, 2012, 2(3): 462-469. doi: 10.1016/j.celrep.2012.08.005.

44 Moorhouse AJ, Loats AE, Medler KF, *et al.* The BASP1 transcriptional corepressor modifies chromatin through lipid-dependent and lipid-independent mechanisms [J]. iScience, 2022, 25(8): 104796. doi: 10.1016/j.isci.2022.104796.

45 Kamerkar S, LeBleu VS, Sugimoto H, *et al.* Exosomes facilitate therapeutic targeting of oncogenic *KRAS* in pancreatic cancer [J]. Nature, 2017, 546(7659): 498-503. doi: 10.1038/nature22341.

46 Alharbi M, Lai A, Godbole N, *et al.* Enhancing precision targeting of ovarian cancer tumor cells *in vivo* through extracellular vesicle engineering [J]. Int J Cancer, 2024, 155(8): 1510-1523. doi: 10.1002/ijc.35055.

47 Mei R, Wan Z, Li Z, *et al.* "All-in-One" exosome engineering strategy for effective therapy of familial hypercholesterolemia [J]. ACS Appl Mater Interfaces, 2022, 14(45): 50626-50636. doi: 10.1021/acsami.2c15785.

48 Wei S, Li J, Tuo H, *et al.* ABA-induced cargo proteins loading in extracellular vesicles for gene editing [J]. Cells, 2026, 15(5): 405. doi: 10.3390/cells15050405.

49 Whitley JA, Kim S, Lou L, *et al.* Encapsulating Cas9 into

extracellular vesicles by protein myristoylation [J]. J Extracell Vesicles, 2022, 11(4): e12196. doi: 10.1002/jev2.12196.

50 Smyth T, Petrova K, Payton NM, *et al.* Surface functionalization of exosomes using click chemistry [J]. Bioconjug Chem, 2014, 25(10): 1777-1784. doi: 10.1021/bc500291r.

51 Kooijmans SAA, Fliervoet LAL, 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.

52 Shi S, Li T, Wen X, *et al.* Copper-64 labeled PEGylated exosomes for *in vivo* positron emission tomography and enhanced tumor retention [J]. Bioconjug Chem, 2019, 30(10): 2675-2683. doi: 10.1021/acs.bioconjchem.9b00587.

53 Jia G, Han Y, An Y, *et al.* NRP-1 targeted and cargo-loaded exosomes facilitate simultaneous imaging and therapy of glioma *in vitro* and *in vivo* [J]. Biomaterials, 2018, 178: 302-316. doi: 10.1016/j.biomaterials.2018.06.029.

54 Qi H, Liu C, Long L, *et al.* Blood exosomes endowed with magnetic and targeting properties for cancer therapy [J]. ACS Nano, 2016, 10(3): 3323-3333. doi: 10.1021/acsnano.5b06939.

55 Lee TS, Kim Y, Zhang W, *et al.* Facile metabolic glycan labeling strategy for exosome tracking [J]. Biochim Biophys Acta Gen Subj, 2018, 1862(5): 1091-1100. doi: 10.1016/j.bbagen.2018.02.001.

56 Song S, Shim MK, 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. doi: 10.1021/acs.bioconjchem.0c00216.

57 Tian T, Zhang HX, He CP, *et al.* Surface functionalized exosomes as targeted drug delivery vehicles for cerebral ischemia therapy [J]. Biomaterials, 2018, 150: 137-149. doi: 10.1016/j.biomaterials.2017.10.012.

58 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 [J]. ACS Nano, 2018, 12(7): 6830-6842. doi: 10.1021/acsnano.8b02053.

59 Tenchov R, Sasso JM, Wang X, *et al.* Exosomes—nature's lipid nanoparticles, a rising star in drug delivery and diagnostics [J]. ACS Nano, 2022, 16(11): 17802-17846. doi: 10.1021/acsnano.2c08774.

60 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. doi: 10.1038/mt.2010.105.

61 Zhuang X, Xiang X, Grizzle W, *et al.* Treatment of brain inflammatory diseases by delivering exosome encapsulated anti-inflammatory drugs from the nasal region to the brain [J]. Mol Ther, 2011, 19(10): 1769-1779. doi: 10.1038/mt.2011.164.

62 Kim MS, Haney MJ, Zhao Y, *et al.* Development of exosome-encapsulated paclitaxel to overcome MDR in cancer cells [J]. Nanomedicine, 2016, 12(3): 655-664. doi: 10.1016/j.nano.2015.10.012.

63 Haney MJ, Klyachko NL, 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.

64 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.

65 Pomatto MAC, 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.

66 Lener T, Gimona M, Aigner L, *et al.* Applying extracellular vesicles based therapeutics in clinical trials - an ISEV position paper [J]. J Extracell Vesicles, 2015, 4: 30087. doi: 10.3402/jev.v4.30087.

67 Johnsen KB, Gudbergsson JM, Skov MN, *et al.* Evaluation of electroporation-induced adverse effects on adipose-derived stem cell exosomes [J]. Cytotechnology, 2016, 68(5): 2125-2138. doi: 10.1007/s10616-016-9952-7.

68 Hood JL, Scott MJ, Wickline SA. Maximizing exosome colloidal stability following electroporation [J]. Anal Biochem, 2014, 448: 41-49. doi: 10.1016/j.ab.2013.12.001.

69 Squadrito ML, Baer C, Burdet F, *et al.* Endogenous RNAs modulate microRNA sorting to exosomes and transfer to acceptor cells [J]. Cell Rep, 2014, 8(5): 1432-1446. doi: 10.1016/j.celrep.2014.07.035.

70 Reshke R, Taylor JA, Savard A, *et al.* Reduction of the therapeutic dose of silencing RNA by packaging it in extracellular vesicles via a pre-microRNA backbone [J]. Nat Biomed Eng, 2020, 4(1): 52-68. doi: 10.1038/s41551-019-0502-4.

71 Yim N, Ryu SW, Choi K, *et al.* Exosome engineering for efficient intracellular delivery of soluble proteins using optically reversible protein-protein interaction module [J]. Nat Commun, 2016, 7: 12277. doi: 10.1038/ncomms12277.

72 Sterzenbach U, Putz U, Low LH, *et al.* Engineered exosomes as vehicles for biologically active proteins [J]. Mol Ther, 2017, 25(6): 1269-1278. doi: 10.1016/j.ymthe.2017.03.030.

73 Schwarz G, Ren X, Xie W, *et al.* Engineered exosomes: a promising drug delivery platform with therapeutic potential [J]. Front Mol Biosci, 2025, 12: 1583992. doi: 10.3389/fmolb.2025.1583992.

74 Tian J, Han Z, Song D, *et al.* Engineered exosome for drug delivery: recent development and clinical applications [J]. Int J Nanomedicine, 2023, 18: 7923-7940. doi: 10.2147/ijn.S444582.

75 Didiot MC, Hall LM, Coles AH, *et al.* Exosome-mediated delivery of hydrophobically modified sirna for huntingtin mRNA silencing [J]. Mol Ther, 2016, 24(10): 1836-1847. doi: 10.1038/mt.2016.126.

76 Haraszti RA, Didiot MC, Sapp E, *et al.* High-resolution proteomic and lipidomic analysis of exosomes and microvesicles from different cell sources [J]. J Extracell Vesicles, 2016, 5: 32570. doi: 10.3402/jev.v5.32570.

77 Kooijmans SAA, 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. doi: 10.1016/j.jconrel.2013.08.014.

78 Lennaćrd AJ, Mamand DR, Wiklander RJ, *et al.* Optimised electroporation for loading of extracellular vesicles with doxorubicin [J]. Pharmaceutics, 2021, 14(1): 38. doi: 10.3390/pharmaceutics14010038.

79 Salarpour S, Forootanfar H, Pournamdari M, *et al.* Paclitaxel incorporated exosomes derived from glioblastoma cells: comparative study of two loading techniques [J]. Daru, 2019, 27(2): 533-539. doi: 10.1007/s40199-019-00280-5.

80 Gazze SA, Thomas SJ, Garcia-Parra J, *et al.* High content, quantitative AFM analysis of the scalable biomechanical properties of extracellular vesicles [J]. Nanoscale, 2021, 13(12): 6129-6141. doi: 10.1039/d0nr09235e.

81 Ye H, Wang F, Xu G, *et al.* Advancements in engineered exosomes for wound repair: current research and future perspectives [J]. Front Bioeng Biotechnol, 2023, 11: 1301362. doi: 10.3389/fbioe.2023.1301362.

82 Ramesh D, Bakkannavar SM, Bhat VR, *et al.* Comparative study on drug encapsulation and release kinetics in extracellular vesicles loaded with snake venom *L*-amino acid oxidase [J]. BMC Pharmacol Toxicol, 2025, 26(1): 98. doi: 10.1186/s40360-025-00938-8.

83 Bosch S, de Beaurepaire L, Allard M, *et al.* Trehalose prevents aggregation of exosomes and cryodamage [J]. Sci Rep, 2016, 6: 36162. doi: 10.1038/srep36162.

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 Jang SC, Kim OY, Yoon CM, *et al.* Bioinspired exosome-mimetic nanovesicles for targeted delivery of chemotherapeutics to malignant tumors [J]. ACS Nano, 2013, 7(9): 7698-7710. doi: 10.1021/nn402232g.

86 Jo W, Jeong D, Kim J, *et al.* Microfluidic fabrication of cell-derived nanovesicles as endogenous RNA carriers [J]. Lab Chip, 2014, 14(7): 1261-1269. doi: 10.1039/c3lc50993a.

87 Le QV, Lee J, Lee H, *et al.* Cell membrane-derived vesicles for delivery of therapeutic agents [J]. Acta Pharm Sin B, 2021, 11(8): 2096-2113. doi: 10.1016/j.apsb.2021.01.020.

88 Brezgin S, Frolova A, Bayurova E, *et al.* Saponin is essential for the isolation of proteins and RNA from biological nanoparticles [J]. Anal Chem, 2024, 96(43): 17432-17443. doi: 10.1021/acs.analchem.4c04607.

89 Sreij R, Dargel C, Schweins R, *et al.* Aescin-cholesterol complexes in DMPC model membranes: a DSC and temperature-dependent scattering study [J]. Sci Rep, 2019, 9(1): 5542. doi: 10.1038/s41598-019-41865-z.

90 de Oliveira M, Costa HPS, Teixeira D, *et al.* Comparison of different encapsulation techniques in exosomes obtained from goat and bovine milk [J]. ACS Omega, 2025, 10(51): 63202-63212. doi: 10.1021/acsomega.5c09524.

91 Lorent J, Lins L, Domenech O, *et al.* Domain formation and permeabilization induced by the saponin α-hederin and its aglycone hederagenin in a cholesterol-containing bilayer [J]. Langmuir, 2014, 30(16): 4556-4569. doi: 10.1021/la4049902.

92 Bangham AD, Horne RW, Glauert AM, *et al.* Action of saponin on biological cell membranes [J]. Nature, 1962, 196: 952-955. doi: 10.1038/196952a0.

93 Auquière M, Terrasi R, Gratpain V, *et al.* Critical evaluation of saponin as a permeabilizer for anandamide encapsulation in extracellular vesicles [J]. Drug Deliv Transl Res, 2025. doi: 10.1007/s13346-025-01951-4.

94 Shi Y, Guo S, Liang Y, *et al.* Construction and evaluation of liraglutide delivery system based on milk exosomes: a new idea for oral peptide delivery [J]. Curr Pharm Biotechnol, 2022, 23(8): 1072-1079. doi: 10.2174/1389201022666210820114236.

95 Gupta N, Polkoff K, Qiao L, *et al.* 200 Developing exosomes as a mediator for CRISPR/Cas-9 delivery [J]. Reprod Fertil Dev, 2018, 31(1): 225. doi: 10.1071/RDv31n1Ab200.

96 Boing AN, van der Pol E, Grootemaat AE, *et al.* Single-step isolation of extracellular vesicles by size-exclusion chromatography [J]. J Extracell Vesicles, 2014, 3: 10.3402/jev.v3.23430.

97 Baranyai T, Herczeg K, Onódi Z, *et al.* Isolation of exosomes from blood plasma: qualitative and quantitative comparison of ultracentrifugation and size exclusion chromatography methods [J]. PLoS One, 2015, 10(12): e0145686. doi: 10.1371/journal.pone.0145686.

98 Corso G, Mager I, Lee Y, *et al.* Reproducible and scalable purification of extracellular vesicles using combined bind-elute and size exclusion chromatography [J]. Sci Rep, 2017, 7(1): 11561. doi: 10.1038/s41598-017-10646-x.

99 Zeng H, Guo S, Ren X, *et al.* Current strategies for exosome cargo loading and targeting delivery [J]. Cells, 2023, 12(10): 1416. doi: 10.3390/cells12101416.

100 Huang L, Wu E, Liao J, *et al.* Research advances of engineered exosomes as drug delivery carrier [J]. ACS Omega, 2023, 8(46): 43374-43387. doi: 10.1021/acsomega.3c04479.

101 Koh HB, Kim HJ, Kang SW, *et al.* Exosome-based drug delivery: translation from bench to clinic [J]. Pharmaceutics, 2023, 15(8): 2042. doi: 10.3390/pharmaceutics15082042.

102 Goudarzi F, Jajarmi V, Shojaee S, *et al.* Formulation and evaluation of atovaquone-loaded macrophage-derived exosomes against toxoplasma gondii: *in vitro* and *in vivo* assessment [J]. Microbiol Spectr, 2024, 12(1): e0308023. doi: 10.1128/spectrum.03080-23.

103 Zhao X, Wu D, Ma X, *et al.* Exosomes as drug carriers for cancer therapy and challenges regarding exosome uptake [J]. Biomed Pharmacother, 2020, 128: 110237. doi: 10.1016/j.biopha.2020.110237.

104 Zhang R, Li D, Zhou Z, *et al.* Chemo-enzymatic functionalization of bovine milk exosomes with an EGFR nanobody for target-specific drug delivery [J]. Chembiochem, 2024, 25(22): e202400512. doi: 10.1002/cbic.202400512.

105 Wang X, Dong J, Kang J, *et al.* Self-adaptive release of stem cell-derived exosomes from a multifunctional hydrogel for accelerating MRSA-infected diabetic wound repair [J]. J Am Chem Soc, 2025, 147(19): 16362-16378. doi: 10.1021/jacs.5c02184.

106 Ghadami S, Dellinger K. Developing and optimizing a biocompatible tauopathy model using extracellular vesicle-mediated gene delivery [J]. Front Med (Lausanne), 2025, 12: 1672046. doi: 10.3389/fmed.2025.1672046.

107 Gul R, Bashir H, Sarfraz M, *et al.* Human plasma derived exosomes: impact of active and passive drug loading approaches on drug delivery [J]. Saudi Pharm J, 2024, 32(6): 102096. doi: 10.1016/j.jsps.2024.102096.

108 Abdel-Bar HM, Tandiono S, Liam-Or R, *et al.* Optimizing exosome lipid hybrid nanoparticles for enhanced siRNA delivery and improved therapeutic anticancer efficacy *in vivo* [J]. ACS Nano, 2025, 19(50): 42658-42674. doi: 10.1021/acsnano.5c16991.

109 Liu Y, Ling Y, Tai W. Mechanical extrusion of the plasma membrane to generate ectosome-mimetic nanovesicles for lung targeting [J]. Mol Pharm, 2025, 22(1): 304-315. doi: 10.1021/acs.molpharmaceut.4c00927.

110 Jang YJ, Cha BS, Kim D, *et al.* Extracellular vesicles, as drug-delivery vehicles, improve the biological activities of astaxanthin [J]. Antioxidants (Basel), 2023, 12(2): 473. doi: 10.3390/antiox12020473.

111 Garcia-Martin R, Wang G, Brandao BB, *et al.* MicroRNA sequence codes for small extracellular vesicle release and cellular retention [J]. Nature, 2022, 601(7893): 446-451. doi: 10.1038/s41586-021-04234-3.

112 Villarroya-Beltri C, Gutiérrez-Vázquez C, Sánchez-Cabo F, *et al.* Sumoylated hnRNPA2B1 controls the sorting of miRNAs into exosomes through binding to specific motifs [J]. Nat Commun, 2013, 4: 2980. doi: 10.1038/ncomms3980.

113 Corsi J, Semnani PS, Peroni D, *et al.* Small molecule inhibitors of hnRNPA2B1-RNA interactions reveal a predictable sorting of RNA subsets into extracellular vesicles [J]. Nucleic Acids Res, 2025, 53(5): gkaf176. doi: 10.1093/nar/gkaf176.

114 Li C, Qin F, Wang W, *et al.* hnRNPA2B1-mediated extracellular vesicles sorting of miR-122-5p potentially promotes lung cancer progression [J]. Int J Mol Sci, 2021, 22(23):12866. doi: 10.3390/ijms222312866.

115 Shurtleff MJ, Temoche-Diaz MM, Karfilis KV, *et al.* Y-box protein 1 is required to sort microRNAs into exosomes in cells and in a cell-free reaction [J]. Elife, 2016, 5: e19276. doi: 10.7554/eLife.19276.

116 Liu XM, Ma L, Schekman R. Selective sorting of microRNAs into exosomes by phase-separated YBX1 condensates [J]. Elife, 2021, 10: e71982. doi: 10.7554/eLife.71982.

117 Santangelo L, Giurato G, Cicchini C, *et al.* The RNA-binding protein SYNCRIP is a component of the hepatocyte exosomal machinery controlling microRNA sorting [J]. Cell Rep, 2016, 17(3): 799-808. doi: 10.1016/j.celrep.2016.09.031.

118 Teng Y, Ren Y, Hu X, *et al.* MVP-mediated exosomal sorting of miR-193a promotes colon cancer progression [J]. Nat Commun, 2017, 8: 14448. doi: 10.1038/ncomms14448.

119 Wang Q, Yu J, Kadungure T, *et al.* ARMMs as a versatile platform for intracellular delivery of macromolecules [J]. Nat Commun, 2018, 9(1): 960. doi: 10.1038/s41467-018-03390-x.

120 Baietti MF, Zhang Z, Mortier E, *et al.* Syndecan-syntenin-ALIX regulates the biogenesis of exosomes [J]. Nat Cell Biol, 2012, 14(7): 677-685. doi: 10.1038/ncb2502.

121 Hung ME, Leonard JN. A platform for actively loading cargo RNA to elucidate limiting steps in EV-mediated delivery [J]. J Extracell Vesicles, 2016, 5(1): 31027. doi: 10.3402/jev.v5.31027.

122 Sutaria DS, Jiang J, Elgamal OA, *et al.* Low active loading of cargo into engineered extracellular vesicles results in inefficient miRNA mimic delivery [J]. J Extracell Vesicles, 2017, 6(1): 1333882. doi: 10.1080/20013078.2017.1333882.

123 Watkins NJ, Segault V, Charpentier B, *et al.* A common core RNP structure shared between the small nucleoar box C/D RNPs and the spliceosomal U4 snRNP [J]. Cell, 2000, 103(3): 457-466. doi: 10.1016/s0092-8674(00)00137-9.

124 Joshi BS, de Beer MA, Giepmans BNG, *et al.* Endocytosis of extracellular vesicles and release of their cargo from endosomes [J]. ACS Nano, 2020, 14(4): 4444-4455.

doi: 10.1021/acsnano.9b10033.

125 Saito H, Kobayashi T, Hara T, *et al.* Synthetic translational regulation by an L7Ae-kink-turn RNP switch [J]. Nat Chem Biol, 2010, 6(1): 71-78. doi: 10.1038/nchembio.273.

126 Auslander S, Auslander D, Muller M, *et al.* Programmable single-cell mammalian biocomputers [J]. Nature, 2012, 487 (7405): 123-127. doi: 10.1038/nature11149.

127 Stripecke R, Oliveira CC, McCarthy JE, *et al.* Proteins binding to 5′ untranslated region sites: a general mechanism for translational regulation of mRNAs in human and yeast cells [J]. Mol Cell Biol, 1994, 14(9): 5898-5909. doi: 10.1128/mcb.14.9.5898-5909.1994.

128 Meyer C, Losacco J, Stickney Z, *et al.* Pseudotyping exosomes for enhanced protein delivery in mammalian cells [J]. Int J Nanomedicine, 2017, 12: 3153-3170. doi: 10.2147/ijn.S133430.

129 Levy D, Wang D, Afzali H, *et al.* Hijacking exosome biogenesis: viral glycoproteins as modular scaffolds for engineering functionalized extracellular vesicles [J]. Nanoscale, 2026, 18(4): 2252-2263. doi: 10.1039/d5nr03704b.

130 Zhang X, Xu Q, Zi Z, *et al.* Programmable extracellular vesicles for macromolecule delivery and genome modifications [J]. Dev Cell, 2020, 55(6): 784-801. e9. doi: 10.1016/j.devcel.2020.11.007.

131 Montagna C, Petris G, Casini A, *et al.* VSV-G-enveloped vesicles for traceless delivery of CRISPR-Cas9 [J]. Mol Ther Nucleic Acids, 2018, 12: 453-462. doi: 10.1016/j.omtn.2018.05.010.

132 Zeng W, Zheng L, Li Y, *et al.* Engineered extracellular vesicles for delivering functional Cas9/gRNA to eliminate hepatitis B virus cccDNA and integration [J]. Emerg Microbes Infect, 2024, 13(1): 2284286. doi: 10.1080/22221751.2023.2284286.

133 Mangeot PE, Risson V, Fusil F, *et al.* Genome editing in primary cells and *in vivo* using viral-derived Nanoblades loaded with Cas9-sgRNA ribonucleoproteins [J]. Nat Commun, 2019, 10(1): 45. doi: 10.1038/s41467-018-07845-z.

134 Gutierrez-Guerrero A, Abrey Recalde MJ, Mangeot PE, *et al.* Baboon envelope pseudotyped "Nanoblades" carrying Cas9/gRNA complexes allow efficient genome editing in human T, B, and CD34(+) cells and knock-in of AAV6-encoded donor DNA in CD34(+) cells [J]. Front Genome Ed, 2021, 3: 604371. doi: 10.3389/fgeed.2021.604371.

135 Gilleron J, Querbes W, Zeigerer A, *et al.* Image-based analysis of lipid nanoparticle-mediated siRNA delivery, intracellular trafficking and endosomal escape [J]. Nat Biotechnol, 2013, 31(7): 638-646. doi: 10.1038/nbt.2612.

136 Polanco JC, Hand GR, Briner A, *et al.* Exosomes induce endolysosomal permeabilization as a gateway by which exosomal tau seeds escape into the cytosol [J]. Acta Neuropathol, 2021, 141(2): 235-256. doi: 10.1007/s00401-020-02254-3.

137 Minoves M, Ouldali M, Belot L, *et al.* Structures of vesicular stomatitis virus glycoprotein G alone and bound to a neutralizing antibody [J]. PLoS Pathog, 2025, 21(10): e1013589. doi: 10.1371/journal.ppat.1013589.

138 Ferlin A, Raux H, Baquero E, *et al.* Characterization of pH-sensitive molecular switches that trigger the structural transition of vesicular stomatitis virus glycoprotein from the postfusion state toward the prefusion state [J]. J Virol, 2014, 88(22): 13396-13409. doi: 10.1128/jvi.01962-14.

139 Mangeot PE, Dollet S, Girard M, *et al.* Protein transfer into human cells by VSV-G-induced nanovesicles [J]. Mol Ther, 2011, 19(9): 1656-1666. doi: 10.1038/mt.2011.138.

140 Taslimi A, Vrana JD, Chen D, *et al.* An optimized optogenetic clustering tool for probing protein interaction and function [J]. Nat Commun, 2014, 5: 4925. doi: 10.1038/ncomms5925.

141 Ma L, Guan Z, Wang Q, *et al.* Structural insights into the photoactivation of arabidopsis CRY2 [J]. Nat Plants, 2020, 6(12): 1432-1438. doi: 10.1038/s41477-020-00800-1.

142 Zetsche B, Volz SE, Zhang F. A split-Cas9 architecture for inducible genome editing and transcription modulation [J]. Nat Biotechnol, 2015, 33(2): 139-142. doi: 10.

1038/nbt. 3149.

143 Osteikoetxea X, Silva A, Lazaro-Ibanez E, *et al.* Engineered Cas9 extracellular vesicles as a novel gene editing tool [J]. J Extracell Vesicles, 2022, 11(5): e12225. doi: 10. 1002/jev2. 12225.

144 Liu B, Chen L, Huang C, *et al.* A sprayable exosome-loaded hydrogel with controlled release and multifunctional synergistic effects for diabetic wound healing [J]. Mater Today Bio, 2025, 34: 102159. doi: 10. 1016/j. mtbio. 2025. 102159.

145 Liu Y, Dong W, Hu C, *et al.* *In vitro* osteogenic and angiogenic potential of 3D-printed nHA/PCL scaffolds functionalized with a photo-crosslinked CSMA hydrogel-exosome composite coating [J]. Coatings, 2026, 16(2): 201. doi: 10. 3390/coatings16020201.

146 Shi W, Zheng J, Zhang J, *et al.* Desktop-stereolithography 3D printing of a decellularized extracellular matrix/mesenchymal stem cell exosome bioink for vaginal reconstruction [J]. Tissue Eng Regen Med, 2024, 21(6): 943-957. doi: 10. 1007/s13770-024-00649-x.

147 Li S, Li Y, Chen Y, *et al.* pH-responsive hydrogel system loaded with curcumin-preconditioned mesenchymal stem cell exosomes for enhanced diabetic wound healing in orthopedic applications [J]. Front Bioeng Biotechnol, 2025, 13: 1688905. doi: 10. 3389/fbioe. 2025. 1688905.

148 Zhang Y, Li M, Song S, *et al.* Multiple dynamic crosslinked multifunctional hydrogels with glucose/pH dual-responsive adipose-derived stem cells-exosomes-releasing for diabetic wound healing [J]. Burns Trauma, 2025, 13: tkaf059. doi: 10. 1093/burnst/tkaf059.

149 Xi Y, Zhang Z, Zhao Z, *et al.* Injectable thymosin β4-modified hyaluronic acid hydrogel with exosomes for stem cell homing and neuronic-angiogenic-osteogenic coupled cranial repair [J]. ACS Nano, 2025, 19(25): 22710-22724. doi: 10. 1021/acsnano. 4c10386.

150 Wang H, Gao X, Zhao Y, *et al.* Exosome-loaded GelMA hydrogel as a cell-free therapeutic strategy for hypertrophic scar inhibition [J]. Clin Cosmet Investig Dermatol, 2025, 18: 1137-1149. doi: 10. 2147/ccid. S520913.

151 Huang J, Li H, Mei Y, *et al.* An injectable hydrogel bioimplant loaded with engineered exosomes and triple anti-tuberculosis drugs with potential for treating bone and joint tuberculosis [J]. Int J Nanomedicine, 2025, 20: 1285-1302. doi: 10. 2147/ijn. S480288.

152 Wang L, Wei X, He X, *et al.* Osteoinductive dental pulp stem cell-derived extracellular vesicle-loaded multifunctional hydrogel for bone regeneration [J]. ACS Nano, 2024, 18(12): 8777-8797. doi: 10. 1021/acsnano. 3c11542.

153 Zhang S, Lu X, Chen J, *et al.* Promotion of angiogenesis and suppression of inflammatory response in skin wound healing using exosome-loaded collagen sponge [J]. Front Immunol, 2024, 15: 1511526. doi: 10. 3389/fimmu. 2024. 1511526.

154 Zhang Y, Xie Y, Hao Z, *et al.* Umbilical mesenchymal stem cell-derived exosome-encapsulated hydrogels accelerate bone repair by enhancing angiogenesis [J]. ACS Appl Mater Interfaces, 2021, 13(16): 18472-18487. doi: 10. 1021/acsami. 0c22671.

155 Li R, Qi Q, Jiang X, *et al.* Exosome microsphere/nano silver loaded injectable antibacterial hydrogel augments anti-infection and healing for scald wound [J]. Front Microbiol, 2025, 16: 1550276. doi: 10. 3389/fmicb. 2025. 1550276.

156 Nie H, Jiang Z. Bone mesenchymal stem cell-derived extracellular vesicles deliver microRNA-23b to alleviate spinal cord injury by targeting toll-like receptor TLR4 and inhibiting NF-κB pathway activation [J]. Bioengineered, 2021, 12(1): 8157-8172. doi: 10. 1080/21655979. 2021. 1977562.

157 Lu X, Dai S, Huang B, *et al.* Exosomes loaded a smart bilayer-hydrogel scaffold with ROS-scavenging and macrophage-reprogramming properties for repairing cartilage defect [J]. Bioact Mater, 2024, 38: 137-153. doi: 10. 1016/j. bioactmat. 2024. 04. 017.

158 Liu C, Hu F, Jiao G, *et al.* Dental pulp stem cell-derived exosomes suppress M1 macrophage polarization through the ROS-MAPK-NFκB P65 signaling pathway after spinal cord injury [J]. J Nanobiotechnology, 2022, 20(1): 65. doi:

10.1186/s12951-022-01273-4.

159 Tian J, Wang Z, Tang Z, *et al.* Engineered exosomes conferred with ROS-regulation and immuno-suppression for ameliorating lupus nephritis [J]. J Nanobiotechnology, 2025, 23(1): 639. doi: 10.1186/s12951-025-03731-1.

160 Xue R, Xie M, Wu Z, *et al.* Mesenchymal stem cell-derived exosomes promote recovery of the facial nerve injury through regulating macrophage M1 and M2 polarization by targeting the P38 MAPK/NF-κB pathway [J]. Aging Dis, 2024, 15(2): 851-868. doi: 10.14336/ad.2023.0719-1.

161 Luan Z, Liu J, Li M, *et al.* Exosomes derived from umbilical cord-mesenchymal stem cells inhibit the NF-κB/MAPK signaling pathway and reduce the inflammatory response to promote recovery from spinal cord injury [J]. J Orthop Surg Res, 2024, 19(1): 184. doi: 10.1186/s13018-024-04651-w.

162 Sun Z, Xu Y, Shao B, *et al.* Exosomal circPOLQ promotes macrophage M2 polarization via activating IL-10/STAT3 axis in a colorectal cancer model [J]. J Immunother Cancer, 2024, 12(5): e008491. doi: 10.1136/jitc-2023-008491.

163 Kumar P, Wu H, McBride JL, *et al.* Transvascular delivery of small interfering RNA to the central nervous system [J]. Nature, 2007, 448(7149): 39-43. doi: 10.1038/nature05901.

164 Yang J, Zhang X, Chen X, *et al.* Exosome mediated delivery of miR-124 promotes neurogenesis after ischemia [J]. Mol Ther Nucleic Acids, 2017, 7: 278-287. doi: 10.1016/j.omtn.2017.04.010.

165 Jiang P, Xiao Y, Hu X, *et al.* RVG29 peptide-modified exosomes loaded with miR-133b mediate the RhoA-ROCK pathway to improve motor and neurological symptoms in Parkinson's disease [J]. ACS Biomater Sci Eng, 2024, 10(5): 3069-3085. doi: 10.1021/acsbiomaterials.3c01622.

166 Esteves M, Abreu R, Fernandes H, *et al.* MicroRNA-124-3p-enriched small extracellular vesicles as a therapeutic approach for Parkinson's disease [J]. Mol Ther, 2022, 30(10): 3176-3192. doi: 10.1016/j.ymthe.2022.06.003.

167 Cheng LC, Pastrana E, Tavazoie M, *et al.* miR-124 regulates adult neurogenesis in the subventricular zone stem cell niche [J]. Nat Neurosci, 2009, 12(4): 399-408. doi: 10.1038/nn.2294.

168 Conaco C, Otto S, Han JJ, *et al.* Reciprocal actions of REST and a microRNA promote neuronal identity [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006, 103(7): 2422-2427. doi: 10.1073/pnas.0511041103.

169 Mokabber H, Najafzadeh N, Mohammadzadeh Vardin M. miR-124 promotes neural differentiation in mouse bulge stem cells by repressing Ptbp1 and Sox9 [J]. J Cell Physiol, 2019, 234(6): 8941-8950. doi: 10.1002/jcp.27563.

170 Topol L, Chen W, Song H, *et al.* Sox9 inhibits Wnt signaling by promoting beta-catenin phosphorylation in the nucleus [J]. J Biol Chem, 2009, 284(5): 3323-3333. doi: 10.1074/jbc.M808048200.

171 Cui Y, Yin Y, Xiao Z, *et al.* LncRNA Neat1 mediates miR-124-induced activation of Wnt/β-catenin signaling in spinal cord neural progenitor cells [J]. Stem Cell Res Ther, 2019, 10(1): 400. doi: 10.1186/s13287-019-1487-3.

172 Papadimitriou E, Koutsoudaki PN, Thanou I, *et al.* A miR-124-mediated post-transcriptional mechanism controlling the cell fate switch of astrocytes to induced neurons [J]. Stem Cell Reports, 2023, 18(4): 915-935. doi: 10.1016/j.stemcr.2023.02.009.

173 Wischnjow A, Sarko D, Janzer M, *et al.* Renal targeting: peptide-based drug delivery to proximal tubule cells [J]. Bioconjug Chem, 2016, 27(4): 1050-1057. doi: 10.1021/acs.bioconjchem.6b00057.

174 Vegt E, Melis M, Eek A, *et al.* Renal uptake of different radiolabelled peptides is mediated by megalin: SPECT and biodistribution studies in megalin-deficient mice [J]. Eur J Nucl Med Mol Imaging, 2011, 38(4): 623-632. doi: 10.1007/s00259-010-1685-9.

175 Wang G, Li Q, Chen D, *et al.* Kidney-targeted rhein-loaded liponanoparticles for diabetic nephropathy therapy via size control and enhancement of renal cellular uptake

〔J〕. Theranostics, 2019, 9(21): 6191-6208. doi: 10.7150/thno.37538.

176 Guo Q, Geng K, Wan J, *et al.* Lysozyme-targeted liposomes for enhanced tubular targeting in the treatment of acute kidney injury〔J〕. Acta Biomater, 2025, 192: 394-408. doi: 10.1016/j.actbio.2024.12.026.

177 Zhang A, Wang H, Wang B, *et al.* Exogenous miR-26a suppresses muscle wasting and renal fibrosis in obstructive kidney disease〔J〕. Faseb J, 2019, 33(12): 13590-13601. doi: 10.1096/fj.201900884R.

178 Wang B, Zhang A, Wang H, *et al.* miR-26a limits muscle wasting and cardiac fibrosis through exosome-mediated microRNA transfer in chronic kidney disease〔J〕. Theranostics, 2019, 9(7): 1864-1877. doi: 10.7150/thno.29579.

179 Zheng H, Ji J, Zhao T, *et al.* Exosome-encapsulated miR-26a attenuates aldosterone-induced tubulointerstitial fibrosis by inhibiting the CTGF/SMAD3 signaling pathway〔J〕. Int J Mol Med, 2023, 51(2): 11. doi: 10.3892/ijmm.2022.5214.

180 Chung YH, Huang GK, Kang CH, *et al.* MicroRNA-26a-5p restoration ameliorates unilateral ureteral obstruction-induced renal fibrosis in mice through modulating TGF-β signaling〔J〕. Lab Invest, 2023, 103(7): 100131. doi: 10.1016/j.labinv.2023.100131.

181 Chen Z, Wang J, Zhou J, *et al.* Tripterygium drug-loaded liposome alleviates renal function by promoting vascularization and inhibiting fibrosis〔J〕. Front Chem, 2024, 12: 1427670. doi: 10.3389/fchem.2024.1427670.

182 Longfei H, Wenyuan H, Weihua F, *et al.* Exosomes in cartilage microenvironment regulation and cartilage repair〔J〕. Front Cell Dev Biol, 2025, 13: 1460416. doi: 10.3389/fcell.2025.1460416.

183 Xu X, Liang Y, Li X, *et al.* Exosome-mediated delivery of kartogenin for chondrogenesis of synovial fluid-derived mesenchymal stem cells and cartilage regeneration〔J〕. Biomaterials, 2021, 269: 120539. doi: 10.1016/j.biomaterials.2020.120539.

184 Tao SC, Yuan T, Zhang YL, *et al.* Exosomes derived from miR-140-5p-overexpressing human synovial mesenchymal stem cells enhance cartilage tissue regeneration and prevent osteoarthritis of the knee in a rat model〔J〕. Theranostics, 2017, 7(1): 180-195. doi: 10.7150/thno.17133.

185 Pfeifer JPH, Stievani FC, Fernandes C, *et al.* Influence of inflammation on the expression of microRNA-140 in extracellular vesicles from 2D and 3D culture models of synovial-membrane-derived stem cells〔J〕. Front Bioeng Biotechnol, 2024, 12: 1416694. doi: 10.3389/fbioe.2024.1416694.

186 Miyaki S, Sato T, Inoue A, *et al.* MicroRNA-140 plays dual roles in both cartilage development and homeostasis〔J〕. Genes Dev, 2010, 24(11): 1173-1185. doi: 10.1101/gad.1915510.

187 Karlsen TA, Jakobsen RB, Mikkelsen TS, *et al.* microRNA-140 targets RALA and regulates chondrogenic differentiation of human mesenchymal stem cells by translational enhancement of SOX9 and ACAN〔J〕. Stem Cells Dev, 2014, 23(3): 290-304. doi: 10.1089/scd.2013.0209.

188 Cao H, Chen M, Cui X, *et al.* Cell-free osteoarthritis treatment with sustained-release of chondrocyte-targeting exosomes from umbilical cord-derived mesenchymal stem cells to rejuvenate aging chondrocytes〔J〕. ACS Nano, 2023, 17(14): 13358-13376. doi: 10.1021/acsnano.3c01612.

189 Hie BL, Shanker VR, Xu D, *et al.* Efficient evolution of human antibodies from general protein language models〔J〕. Nat Biotechnol, 2024, 42(2): 275-283. doi: 10.1038/s41587-023-01763-2.

190 Vázquez Torres S, Leung PJY, Venkatesh P, *et al. De novo* design of high-affinity binders of bioactive helical peptides〔J〕. Nature, 2024, 626(7998): 435-442. doi: 10.1038/s41586-023-06953-1.

191 Lu P, Min D, DiMaio F, *et al.* Accurate computational design of multipass transmembrane proteins〔J〕. Science, 2018, 359(6379): 1042-1046. doi: 10.1126/science.aaq1739.

192 Cao L, Coventry B, Goreshnik I, *et al.* Design of protein-binding proteins from the target structure alone〔J〕. Nature, 2022, 605(7910): 551-560. doi: 10.1038/s41586-022-

04654-9.

193 Lin Z, Akin H, Rao R, *et al.* Evolutionary-scale prediction of atomic-level protein structure with a language model〔J〕. Science, 2023, 379(6637): 1123-1130. doi: 10.1126/science.ade2574.

194 Lutz ID, Wang S, Norn C, *et al.* Top-down design of protein architectures with reinforcement learning〔J〕. Science, 2023, 380(6642): 266-273. doi: 10.1126/science.adf6591.

195 Bennett NR, Coventry B, Goreshnik I, *et al.* Improving *de novo* protein binder design with deep learning〔J〕. Nat Commun, 2023, 14(1): 2625. doi: 10.1038/s41467-023-38328-5.

196 Akdel M, Pires DEV, Pardo EP, *et al.* A structural biology community assessment of AlphaFold2 applications〔J〕. Nat Struct Mol Biol, 2022, 29(11): 1056-1067. doi: 10.1038/s41594-022-00849-w.

197 Brotzakis ZF, Zhang S, Murtada MH, *et al.* AlphaFold prediction of structural ensembles of disordered proteins〔J〕. Nat Commun, 2025, 16(1): 1632. doi: 10.1038/s41467-025-56572-9.

198 Vander Meersche Y, Diharce J, Gelly JC, *et al.* Flexibility or uncertainty? A critical assessment of AlphaFold 2 pLDDT〔J〕. Structure, 2025, 33(12): 2157-2163. e2. doi: 10.1016/j.str.2025.09.001.

199 Zhao J, Chen J, Wang H, *et al.* Enhanced thermostability of D-Psicose 3-epimerase from clostridium bolteae through rational design and engineering of new disulfide bridges〔J〕. Int J Mol Sci, 2021, 22(18): 10007. doi: 10.3390/ijms221810007.

200 Gainza P, Wehrle S, Van Hall-Beauvais A, *et al.* *De novo* design of protein interactions with learned surface fingerprints〔J〕. Nature, 2023, 617(7959): 176-184. doi: 10.1038/s41586-023-05993-x.

201 Zhao Y, Wei W, Cheng Z, *et al.* *De novo* design of high-affinity HER2-targeting protein minibinders〔J〕. Biomolecules, 2025,15(11):1587. doi:10.3390/biom15111587.

（责任编辑：张卓）