

文章编号:1003-2754(2023)07-0667-06 doi:10.19845/j.cnki.zfysjjbzz.2023.0153

外泌体及其工程化应用于缺血性脑卒中的研究进展

杨悦悦¹, 马素娜¹, 陈净¹, 吴松¹, 关梦雅¹, 王晶莹¹ 综述, 任彬彬² 审校

摘要: 缺血性脑卒中是一种致残率和死亡率极高的脑血管疾病。目前, 尚无有效的治疗方法能够促进缺血性脑卒中后的神经功能恢复。外泌体既可以介导细胞之间的通信, 又具有跨越血脑屏障的能力, 故在缺血性脑卒中的治疗中受到广泛关注。利用生物工程技术修饰改造外泌体, 制备具有脑靶向性和治疗作用的工程化外泌体, 应用于缺血性脑卒中的研究与治疗, 以期提高脑卒中后神经功能的修复, 减少临床致残率和死亡率, 提高患者的生存和生活质量。本文从外泌体、外泌体在缺血性脑卒中的作用、工程化外泌体的制备等方面进行综述, 并讨论工程化外泌体在治疗缺血性脑卒中的应用前景, 以期为后续研究提供参考。

关键词: 外泌体; 缺血性脑卒中; 生物工程技术; 工程化外泌体

中图分类号:R743.3 文献标识码:A

Research progress on exosomes and their engineering in ischemic stroke YANG Yueyue, MA Suna, CHEN Jing, et al. (Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou 450000, China)

Abstract: Ischemic stroke is a cerebrovascular disease with high disability rate and mortality. At present, there is no effective treatment to promote the recovery of neurological function after ischemic stroke. Exosomes can not only mediate the communication between cells, but also have the ability to cross the blood-brain barrier, so they have received extensive attention in the treatment of ischemic stroke. Exosomes are modified by bioengineering technologies to prepare engineered exosomes with brain targeting and therapeutic effects, which have been applied in the research and treatment of ischemic stroke, in order to improve the repair of neurological function after stroke, reduce the clinical disability rate and mortality, and improve the survival and quality of life of patients. This article reviews exosomes, the role of exosomes in ischemic stroke, and the preparation of engineered exosomes, and discusses the application prospect of engineered exosomes in the treatment of ischemic stroke, with a view to providing a reference for subsequent research.

Key words: Exosomes; Ischemic stroke; Bioengineering technology; Engineered exosomes

缺血性脑卒中(ischemic stroke, IS)是由于脑的供血动脉狭窄或堵塞、脑部供血不足, 继而出现神经功能缺损的脑血管疾病, 约占卒中发病率的 85%。目前, 尚无有效的治疗方法能够促进卒中后神经功能的恢复。

外泌体是从大多数细胞中释放出来的直径 30~150 nm 的细胞外囊泡, 存在于血液、脑脊液、腹水、母乳、唾液和尿液等各种体液中, 具有低免疫原性、生物降解性、低毒性、对内容物的强保护性和跨越血脑屏障(blood-brain barrier, BBB)的能力^[1~3]。既能传递 miRNA 和蛋白质等生物活性物质, 又能介导细胞之间的通信^[4], 具有治疗 IS 中的潜力。然而, 天然外泌体因靶向性低、半衰期短, 功能性内容物的成分和含量不确定限制了其临床应用。利用生物工程技术修饰改造外泌体, 得到具有强靶向性和治疗能力的工程化外泌体, 在各种疾病的治疗中已凸显出巨大潜力^[5~7]。

1 外泌体概述

1.1 外泌体形成 外泌体的形成涉及细胞的质膜内陷, 细胞质膜内陷将一些细胞外成分和细胞

膜蛋白包裹在一起, 形成早期内涵体(early-sorting endosome, ESE), ESEs 进一步发展为成熟的晚期内涵体(late-sorting endosome, LSE), 最终形成细胞内多囊泡体(multivesicular bodies, MVBs), 一部分 MVBs 与溶酶体或自噬体融合被降解; 另一部分与质膜融合以出芽的形式释放到外周环境中, 形成外泌体^[8,9]。MVBs 形成外泌体的过程受到 ALG-2 相互作用蛋白 X、Rab27a、可溶性 N-乙基马来酰亚胺附着蛋白受体蛋白和皮质素等蛋白的调控^[10~12]。

1.2 外泌体的功能 外泌体是具有脂质双层膜的均匀球形结构, 其膜富含四跨膜蛋白(CD63、CD81 和 CD9)、浮舰蛋白-1、ALG-2 相互作用蛋白

收稿日期:2023-01-10; 修订日期:2023-05-25

基金项目:2022 年度河南省中医药拔尖人才培养项目专项课题(2022ZYBJ09); 2022 年财政专项-中医药传承与创新人才工程(CZ0262-10-02)

作者单位:(1. 河南中医药大学, 河南 郑州 450000; 2. 河南中医药大学第一附属医院, 河南 郑州 450099)

通信作者:任彬彬, E-mail: iibinbin@163.com

X、肿瘤易感基因 101、整合素和细胞黏附分子等来自母细胞的细胞表面标记物^[13,14],使外泌体具有异质性、运动能力和与受体细胞膜表面分子结合的能力;此外,外泌体膜还具有保护内容物活性免受降解的胆固醇、鞘磷脂和神经酰胺等物质^[15]。

外泌体不仅具有来自母细胞的蛋白质、脂质、DNA、RNA 和 miRNA 等生物活性物质,而且能够识别特定受体细胞并与之特异性结合,从而介导细胞间的通讯并调节一系列生理病理过程^[16]。一般情况下,外泌体与受体细胞膜融合后通过内吞作用将内容物转移到受体细胞内^[17,18];还可以通过与受体细胞膜上的特定受体结合从而诱导信号传导^[19]。此外,外泌体为纳米级物质,具有跨越 BBB 的天然优势,其机制主要是通过外泌体表面配体与脑血管内皮细胞受体特异性结合^[20]。巨噬细胞 (macrophages) 衍生的外泌体表面有来自母细胞的淋巴细胞功能相关抗原-1,通过与脑微血管内皮细胞表面的细胞间黏附分子-1 和碳水化合物结合 C 型凝集素受体结合跨越 BBB^[21]。Qu 等^[22]通过实验证实来自血液的外泌体通过转铁蛋白和 BBB 的转铁蛋白受体之间的相互作用跨越 BBB。

外泌体是机体内源性产物,不仅具有来自母细胞的生物活性物质,而且能够靶向特定的受体细胞,通过转运其内容物作为细胞间通讯的载体参与各种生理病理过程,在 IS 和其他疾病的治疗中有巨大潜力^[23,24]。

2 外泌体在 IS 中的作用

IS 后的脑修复涉及血管生成、神经发生、少突胶质细胞生成、抗凋亡、氧化应激和炎症反应等一系列复杂过程^[25~27]。大量研究表明,缺血性损伤发生后,外泌体的合成和分泌发生明显变化,预示着外泌体可能参与卒中后神经功能的恢复。

2.1 促进血管生成和神经血管单位重建 以药物促进血管生成和恢复血流是应对卒中后血液供应不足的常见治疗方式,含有大量 miRNAs、蛋白质和脂质的外泌体可能是药物治疗的一种新的选择。骨髓间充质干细胞来源的富含 miR-21-5p 的外泌体能够促进人脐静脉内皮细胞的增殖、迁移和管状形成,并且能够促进 IS 小鼠的血管生成和功能恢复^[28]。此外,内皮细胞和周细胞中的 DLL4-Notch 信号通路对血管生成和 BBB 完整性至关重要,Sharghi 等^[29]发现来自人微血管内皮细胞含有 DLL4 蛋白的外泌体能调节血管生成。因此,以外泌体为载体运输药物在卒中后血管生成和神经血管单元重建中发挥重要作用。

2.2 抑制炎症反应减少神经损伤 炎症反应是脑缺血致病机制之一,可引起脑缺血后的继发性脑损伤。间充质干细胞 (mesenchymal stem cells, MSCs) 衍生的外泌体能通过上调抗炎因子 (IL-4 和 IL-10) 和下调促炎细胞因子 (IL-6、TNF- α 和 IL-1) 的表达来抑制小胶质细胞的炎症,继而改善急性脑缺血损伤^[29]。新近研究发现,富含 miR-138-5p 的外泌体通过下调脂质运载蛋白-2 促进卒中后星形胶质细胞的增殖和抑制炎症反应来减少神经损伤^[30]。此外,研究表明脑卒中患者和 MCAO 大鼠模型中的 miR-126 水平均降低,而富含 miR-126 的外泌体可以抑制神经炎症、促进神经发生、改善卒中后的功能恢复^[31]。可见,抗炎是对抗缺血性损伤的关键机制,特定外泌体可能对炎症反应发挥一定的作用。

2.3 抑制细胞凋亡并促进神经发生 抑制细胞凋亡和促进神经发生是 IS 恢复的重要过程^[32]。研究表明,多数细胞的外泌体可以通过抑制细胞凋亡和促进神经发生减轻缺血模型中的脑损伤^[26,33]。Huang 等^[34]证实,血清衍生的外泌体通过抑制脑内皮细胞凋亡和逆转自噬保护血脑屏障的完整性,改善神经系统的功能。源自脂肪间充质干细胞富含 miR-30d-5p 的外泌体通过抑制自噬和促进 M2 小胶质细胞极化,减少卒中大鼠模型脑梗死的面积^[29]。Wei 等^[35]通过动物实验证实富含 Zeb2/Axin2 的外泌体通过下调转录因子 SOX10、内皮素-3/内皮素受体 B 和 Wnt/ β -catenin 的表达水平,促进神经干细胞的增殖和分化,改善大脑中动脉闭塞 (middle cerebral artery occlusion, MCAO) 大鼠的神经可塑性和功能恢复。由此可见,具有活性成分的外泌体可能通过抑制细胞凋亡和增强神经发生,改善缺血性脑卒中后的神经功能恢复。

3 工程化外泌体的制备技术

安全有效的递送药物是治疗 IS 的有效途径,外泌体不仅具有纳米级体积,而且能够跨越血脑屏障,是可用的药物递送载体^[36]。然而,天然外泌体因靶向能力不足、循环半衰期短、功能性内容物成分和含量的不确定性,在临床应用中受到限制。利用生物工程技术对天然外泌体进行改造,将靶向肽、外源性分子、药物、蛋白质、脂质和核酸等物质加载到外泌体腔或其表面见图 1,从而提高外泌体的靶向性和稳定性,赋予其特定的治疗作用以实现治疗疾病的目的。目前,制备工程化外泌体的技术主要有表面修饰和内容物改造两大类见图 2。

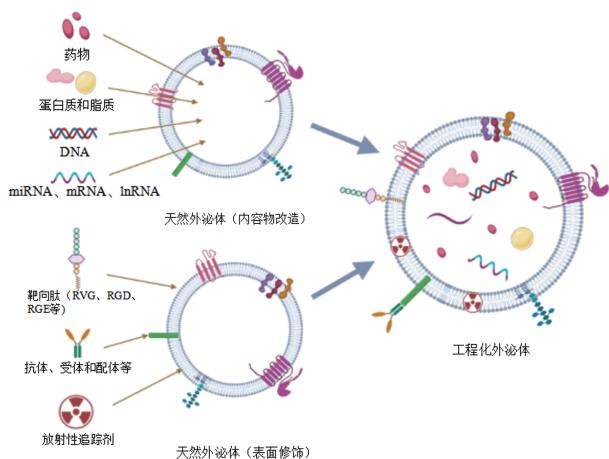


图 1 外泌体的改造策略

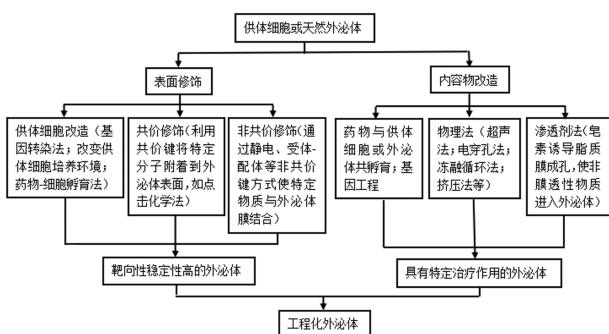


图 2 工程化外泌体制备技术

3.1 外泌体的表面修饰技术 外泌体的表面修饰可以提高其靶向性和稳定性。基因工程修饰供体细胞或外泌体是常用的表面修饰技术,如狂犬病病毒糖蛋白(rabies virus glycoprotein, RVG)与溶酶体相关膜蛋白2b(lysosome-associated membrane glycoprotein, Lamp2b)融合基因转染树突状细胞后可以分泌具有脑靶向性的 RVG 外泌体(RVG-Exo)^[37]。但基因转染对设备要求较高,操作复杂,且容易影响膜蛋白原有的生物活性。除基因工程修饰外,共价修饰也是常用的表面修饰技术。主要通过点击化学或叠氮化物-炔烃环加成的交联反应进行。Lee 等^[38]首先制备含有叠氮化物脂质的外泌体,然后使用无铜催化点击化学将其与靶向肽偶联,提高外泌体靶向癌细胞的能力。此外,表面修饰还可以通过各种非共价修饰实现。最常用的是受体-配体结合法和基于高阳离子物质与外泌体膜上带负电荷官能团之间相互作用的多价静电法^[39]。

3.2 外泌体的内容物改造技术 利用生物工程技术将药物分子加载到外泌体中,赋予外泌体特定的治疗作用。药物共孵育法操作相对简单,是常用的内容物改造方法。主要有两种形式,一种是将

药物与供体细胞共孵育,得到封存特定药物的细胞,在细胞内外泌体形成过程中通过内吞作用将药物加载到外泌体中^[40];另一种是药物直接与外泌体共孵育^[41],高浓度的疏水药物通常具有相对较高的负载效率。对于不能直接加载到外泌体上的 RNA 或蛋白质,常采用基因工程转染供体细胞的方式加载到外泌体中^[42]。目前,常用超声法^[43]、电穿孔法^[44]、冻融循环法^[45]和挤压法^[46]等物理方法将药物导入外泌体,但会破坏外泌体膜的结构,可能造成药物泄露;另有研究证实,渗透剂法能更大程度的增加外泌体的载药效率,但大多数渗透剂(如皂素)有一定的毒性,使用前需进行洗涤^[47]。

总之,在实际应用中无论采用哪种技术,都应综合考虑药物性质、载药量、装载效率、外泌体膜损伤以及对后续实验的影响等因素,寻找最佳改造方式。

4 工程化外泌体在 IS 治疗中的应用

通过表面修饰和内容物改造后的外泌体,具有更高的靶向性,在体循环中不易被肝脏清除,并且包载治疗某种疾病的特定药物。在各种疾病的治疗中有不可估量的作用。目前已有大量工程化外泌体应用于 IS 的治疗。

4.1 表面修饰的工程化外泌体与 IS 表面修饰工程能够增强外泌体的脑靶向性和稳定性见表 1。目前,常用靶向肽修饰增强外泌体的脑靶向性。RVG 是应用较多的脑靶向肽,与 Lamp2b 融合后转染外泌体制备具有脑靶向性的 RVG 外泌体(RVG-Exo)^[48];抑制剂首位环多肽 C(RGDyK)是另一种常用的多肽靶向分子,通过共价修饰偶联到外泌体表面,得到 C(RGDyK)修饰的外泌体(cRGD-Exo)可以靶向缺血性脑损伤区域^[6]; RGD-4C 肽(ACD-CRGDCFC)融合 C1C2 结构域的重组蛋白附着到外泌体表面,形成的 RGD-C1C2-Exo 能够靶向缺血脑组织的损伤区域,并抑制卒中后炎症^[49]。此外,含有氧化铁纳米颗粒(IONP)的 MSCs 衍生的磁性外泌体在磁导航的外部磁场的帮助下使外泌体靶向脑缺血病灶的能力提高了 5.1 倍,并促进了缺血性脑病灶中的抗炎反应、血管生成和抗细胞凋亡^[50]。

神经元缺血性损伤后,缺血区会出现蛋白的异常表达,使用表达异常蛋白的抗体修饰外泌体,也可以使载药外泌体靶向脑缺血区。在 MCAO 动物模型中,缺血半暗带区受损神经元的特异性蛋白质 GAP43 表达增加,因此在载药外泌体表面修饰 GAP43 的单克隆抗体(mAb GAP43),可以靶向缺血半暗带中 GAP43 高表达的受损神经元,从而减轻脑缺血性损伤^[51]。通过脑靶向肽、特定抗体等物质修

饰外泌体增强其脑靶向性,能够将药物高效快速的运送到脑损伤区域,从而更好的发挥治疗作用。

4.2 内容物改造的外泌体与 IS 工程化改造外泌体内容物的成分和含量,能更有效地修复卒中后的大脑功能(见表2)。定向操纵干细胞外泌体中miRNA的种类和表达可以增强外泌体的疗效。与天然MSCs外泌体相比,miR-133b、miR-17-92簇或miR138-5p填充的来自MSCs的工程化外泌体可改善卒中后的大脑重塑和功能恢复^[30,52,53];Kim等^[48]通过电穿孔将HMGB1-siRNA加载到RVG-Exo和未修饰的外泌体中,静脉注射MCAO大鼠,证实RVG-Exo的递送效率和治疗效果更佳。除修改外泌体中的miRNA,负载特定细胞因子的工程外泌体也能增强治疗效果。促炎因子干扰素 γ (IFN- γ)可增加细胞对氧化应激的耐受性,制备包载IFN- γ 的外泌体

并将其注射到MCAO大鼠的脑缺血区域,具有更好的神经保护作用^[54];色素上皮衍生因子(PEDF)负载的外泌体通过激活自噬和抑制神经元凋亡来改善脑缺血再灌注(I/R)损伤^[55]。

包载神经营养因子的工程化外泌体也具有治疗潜力,含脑源性神经营养因子(BDNF)的工程化外泌体不仅能抑制MCAO大鼠小胶质细胞的活化,还促进内源性神经干细胞分化为神经元^[56];在具有脑靶向性的工程化外泌体中加载神经生长因子(nerve growth factor,NGF),可以有效地将NGF递送到缺血性皮质中,通过诱导小胶质细胞极化来减少炎症,促进细胞存活^[57]。此外,98%的小分子药物不能通过血脑屏障进入大脑^[58],可以将药物(如姜黄素和脑啡肽)填充到具有脑靶向性的外泌体中^[6,59],进入大脑发挥治疗作用。

表1 用于IS的表面修饰外泌体

外泌体来源	表面修饰物质	应用技术	工程化外泌体	作用机制
树突状细胞衍生的外泌体 ^[37]	RVG-Lamp2b	基因转染	RVG-Exo	靶向脑缺血区,并进入神经元、小胶质细胞、少突胶质细胞
MSCs衍生的外泌体 ^[6]	c(RGDyK)肽	共价修饰	cRGD-Exo	c(RGDyK)肽在缺血性损伤后与脑内皮细胞中的整合素 $\alpha v\beta 3$ 结合,靶向脑缺血区
神经祖细胞衍生的外泌体 ^[49]	RGD-C1C2	药物共孵育	RGD-C1C2-Exo	RGD-C1C2-Exo在缺血性损伤后与脑内皮细胞中的整合素 $\alpha v\beta 3$ 结合,进入病变区脑实质
MSCs ^[50]	IONP	药物细胞共孵育MSCs后,超速离心分离外泌体	含IONP的磁性外泌体	在外部磁场的帮助下使外泌体靶向脑缺血病变更区
源自SD大鼠全血的外泌体 ^[51]	mAb GAP43	共价修饰	mAb GAP43-Exo	靶向缺血半暗带中GAP43高表达的受损神经元
BMSCs ^[57]	tar	表达载体转染BMSCs,超速离心分离外泌体	tar-Exo	tar与BBB的转铁蛋白受体结合跨越BBB,靶向脑缺血区

注:IONP=氧化铁纳米颗粒,mAb GAP43=GAP43的单克隆抗体,BMSCs=骨髓间充质干细胞,tar=转铁蛋白。

表2 用于IS的内容物改造外泌体

外泌体来源	填充物质	应用技术	工程化外泌体	作用机制
RVG-Exo ^[37]	siRNA	电穿孔法	siRNA-RVG-Exo	抑制脑缺血区细胞凋亡
cRGD-Exo ^[6]	cur	药物共孵育	cRGD-Exo-cur	抑制缺血区炎症反应和细胞凋亡
mAb-GAP43-Exo ^[51]	Que	药物共孵育	Que/mAb GAP43-Exo	减少缺血区活性氧的积累,缓解神经功能损伤
MSCs ^[52]	miR-17-92簇	电穿孔法	Exo-miR-17-92	增加卒中后的神经可塑性和功能恢复
hNSC-Exo ^[54]	IFN- γ	药物共孵育	IFN- γ -hNSC-Exo	促进缺血区组织恢复并抑制细胞凋亡
ADSCs ^[55]	PEDF	构建PEDF载体基因转染ADSCs,离心分离外泌体	包载PEDF的外泌体	调节自噬和凋亡来改善脑缺血再灌注损伤
hNSC-Exo ^[56]	BDNF	药物共孵育	BDNF-hNSC-Exo	促进神经再生并减少脑缺血后的神经炎症反应
RVG-Exo ^[57]	NGF	构建NGF载体基因转染RVG-Exo	NGF-RVG-Exo	减少炎症,促进缺血区细胞存活
tar-Exo ^[59]	脑啡肽	电穿孔法	包载脑啡肽的tar-Exo	抑制脑细胞凋亡,促进神经发生

注:cur=姜黄素,Que=槲皮素,hNSC-Exo=人类神经干细胞来源的外泌体,IFN- γ =促炎因子干扰素 γ ,ADSCs=脂肪间充质干细胞。

5 小结与展望

外泌体通过调节 IS 后的血管生成、神经发生、细胞凋亡和炎症反应等过程,改善卒中后神经功能恢复。通过生物工程技术修饰改造后的工程化外泌体可以弥补天然外泌体靶向能力不足、循环半衰期短、功能性内容物成分和含量的不确定等缺陷,针对性地满足临床治疗需求。

研究者们已经将工程化外泌体投入到 IS 的应用研究中,目前仍处于起步阶段。但许多动物实验已证实,工程化外泌体在 IS 治疗中有显著的靶向治疗作用,具有良好的临床应用前景。大量体外研究工程化外泌体的实验表明,体外培养条件对外泌体的生物活性有很大影响;因此,未来研究需要深入了解工程化外泌体对人体是否有不良影响以及人体内环境对工程化外泌体活性的影响,以制备对人体无害且适应人体内环境的外泌体。此外,工程化外泌体在体内的免疫耐受性、稳定性和治疗效果还需要进一步研究。

综上所述,虽然目前工程化外泌体应用于 IS 的研究相对较少,但现有的研究结果均证实工程化外泌体能够促进 IS 后的神经功能恢复,这为 IS 的临床治疗提供了新的方向。尽管工程化外泌体应用于 IS 的机制尚不明确,制备技术也存在很多不足,但随着生物工程技术的不断发展和完善,工程化外泌体在 IS 临床应用研究中将得到不断的推进,为 IS 临床治疗效果的提高提供新的思路和方法。

利益冲突声明:所有作者均声明不存在利益冲突。

作者贡献声明:杨悦悦、马素娜、陈净、吴松、关梦雅、王晶莹负责撰写论文及文献收集;任彬彬负责拟定写作思路、指导撰写论文并最后定稿。

〔参考文献〕

- [1] Ingato D, Lee JU, Sim SJ, et al. Good things come in small packages: Overcoming challenges to harness extracellular vesicles for therapeutic delivery [J]. *J Control Release*, 2016, 241(10): 174-185.
- [2] Kooijmans SAA, Schiffelers RM, Zarovni N, et al. Modulation of tissue tropism and biological activity of exosomes and other extracellular vesicles: New nanotools for cancer treatment [J]. *Pharmacol Res*, 2016, 111(9): 487-500.
- [3] Li C, Qin S, Wen Y, et al. Overcoming the blood-brain barrier: Exosomes as theranostic nanocarriers for precision neuroimaging [J]. *J Control Release*, 2022, 349(9): 902-916.
- [4] Wang MM, Feng YS, Tan ZX, et al. The role of exosomes in stroke [J]. *Mol Biol Rep*, 2020, 47(8): 6217-6228.
- [5] Liang Y, Duan L, Lu J, et al. Engineering exosomes for targeted drug delivery [J]. *Theranostics*, 2021, 11(7): 3183-3195.
- [6] Tian T, Zhang HX, He CP, et al. Surface functionalized exosomes as targeted drug delivery vehicles for cerebral ischemia therapy [J]. *Biomaterials*, 2018, 150(1): 137-149.
- [7] 王璐, 陈梦丽, 何芳, 等. 工程化外泌体介导巨噬细胞清除肿瘤外泌体 [J]. 中国生物工程杂志, 2022, 42(6): 1-11.
- [8] Colombo M, Raposo G, Théry C. Biogenesis, secretion, and intercellular interactions of exosomes and other extracellular vesicles [J]. *Ann Rev Cell Dev Biol*, 2014, 30: 255-289.
- [9] Kalluri R, Lebleu V. The biology, function, and biomedical applications of exosomes [J]. *Science*, 2020, 367(6478): eaau6977.
- [10] 王小霞, 陈煜森, 马晓塘, 等. Rab27a 基因与外泌体的研究进展 [J]. 中国康复理论与实践, 2018, 24(10): 1159-1164.
- [11] 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.
- [12] Fader CM, Sánchez DG, Mestre MB, et al. TI-VAMP/VAMP7 and VAMP3/cellubrevin: two v-SNARE proteins involved in specific steps of the autophagy/multivesicular body pathways [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2009, 1793(12): 1901-1916.
- [13] Pegtel DM, Gould SJ. Exosomes [J]. *Annu Rev Biochem*, 2019, 88(6): 487-514.
- [14] Lötvall J, Hill AF, Hochberg F, et al. Minimal experimental requirements for definition of extracellular vesicles and their functions: a position statement from the International Society for Extracellular Vesicles [J]. *J Extracell Vesicles*, 2014, 3(12): 26913.
- [15] Skotland T, Sagini K, Sandvig K, et al. An emerging focus on lipids in extracellular vesicles [J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2020, 159(3): 308-321.
- [16] Meldolesi J. Exosomes and ectosomes in intercellular communication [J]. *Curr Biol*, 2018, 28(8): R435-R444.
- [17] French KC, Antonyak MA, Cerione RA. Extracellular vesicle docking at the cellular port: Extracellular vesicle binding and uptake [J]. *Semin Cell Dev Biol*, 2017, 67(7): 48-55.
- [18] Prada I, Amin L, Furlan R, et al. A new approach to follow a single extracellular vesicle-cell interaction using optical tweezers [J]. *Bio-techniques*, 2016, 60(1): 35-41.
- [19] Gabrielli M, Battista N, Riganti L, et al. Active endocannabinoids are secreted on extracellular membrane vesicles [J]. *EMBO Rep*, 2015, 16(2): 213-220.
- [20] 李祺, 王秀, 杜丽娜. 外泌体在脑靶向递送中的应用 [J]. 药学学报, 2022, 57(3): 658-669.
- [21] Yuan D, Zhao Y, Banks WA, et al. Macrophage exosomes as natural nanocarriers for protein delivery to inflamed brain [J]. *Biomaterials*, 2017, 142(10): 1-12.
- [22] Qu M, Lin Q, Huang L, et al. Dopamine-loaded blood exosomes targeted to brain for better treatment of Parkinson disease [J]. *J Control Release*, 2018, 287(10): 156-166.
- [23] Chen J, Chopp M. Exosome therapy for stroke [J]. *Stroke*, 2018, 49(5): 1083-1090.
- [24] Azizi F, Askari S, Javadpour P, et al. Potential role of exosome in post-stroke reorganization and/or neurodegeneration [J]. *EXCLI J*, 2020, 19(12): 1590-1606.
- [25] Chavez LM, Huang SS, Macdonald I, et al. Mechanisms of acupuncture therapy in ischemic stroke rehabilitation: A literature review of basic studies [J]. *Int J Mol Sci*, 2017, 18(11): 2270.
- [26] Dabrowska S, Andrzejewska A, Lukomska B, et al. Neuroinflammation as a target for treatment of stroke using mesenchymal stem cells and extracellular vesicles [J]. *J Neuroinflammation*, 2019, 16(1): 178.
- [27] Kang L, Yu H, Yang X, et al. Neutrophil extracellular traps released by neutrophils impair revascularization and vascular remodeling after stroke [J]. *Nat Commun*, 2020, 11(1): 2488.

- [28] Hu H, Hu X, Li L, et al. Exosomes derived from bone marrow mesenchymal stem cells promote angiogenesis in ischemic stroke mice via upregulation of MiR-21-5p[J]. *Biomolecules*, 2022, 12(7):883.
- [29] Sharghi-namini S, Tan E, Ong LL, et al. Dll4-containing exosomes induce capillary sprout retraction in a 3D microenvironment[J]. *Sci Rep*, 2014, 4(9):4031.
- [30] Deng Y, Chen D, Gao F, et al. Exosomes derived from microRNA-138-5p-overexpressing bone marrow-derived mesenchymal stem cells confer neuroprotection to astrocytes following ischemic stroke via inhibition of LCN2[J]. *J Biol Eng*, 2019, 13(8):71.
- [31] Geng W, Tang H, Luo S, et al. Exosomes from miRNA-126-modified ADSCs promotes functional recovery after stroke in rats by improving neurogenesis and suppressing microglia activation[J]. *Am J Transl Res*, 2019, 11(2):780-792.
- [32] Uzdensky AB. Apoptosis regulation in the penumbra after ischemic stroke: expression of pro- and antiapoptotic proteins[J]. *Apoptosis*, 2019, 24(9/10):687-702.
- [33] Manthari RK, Tikka C, Ommati MM, et al. Arsenic induces autophagy in developmental mouse cerebral cortex and hippocampus by inhibiting PI3K/Akt/mTOR signaling pathway: involvement of blood-brain barrier's tight junction proteins[J]. *Arch Toxicol*, 2018, 92(11):3255-3275.
- [34] Huang LY, Song JX, Cai H, et al. Healthy serum-derived exosomes improve neurological outcomes and protect blood-brain barrier by inhibiting endothelial cell apoptosis and reversing autophagy-mediated tight junction protein reduction in rat stroke model[J]. *Front Cell Neurosci*, 2022, 16(3):841544.
- [35] Wei R, Zhang L, Hu W, et al. Zeb2/Axin2-enriched BMSC-derived exosomes promote post-stroke functional recovery by enhancing neurogenesis and neural plasticity[J]. *J Mol Neurosci*, 2022, 72(1):69-81.
- [36] 李思迪, 侯信, 亓洪昭, 等. 外泌体: 为高效药物投递策略提供天然的内源性纳米载体[J]. *化学进展*, 2016, 28(Z2):353-362.
- [37] 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.
- [38] Lee J, Lee H, Goh U, et al. Cellular engineering with membrane fusogenic liposomes to produce functionalized extracellular vesicles[J]. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2016, 8(11):6790-6795.
- [39] Tamura R, Uemoto S, Tabata Y. Augmented liver targeting of exosomes by surface modification with cationized pullulan[J]. *Acta Biomater*, 2017, 57(7):274-284.
- [40] Alzahrani FA. Melatonin improves therapeutic potential of mesenchymal stem cells-derived exosomes against renal ischemia-reperfusion injury in rats[J]. *Am J Transl Res*, 2019, 11(5):2887-2907.
- [41] Haney MJ, Klyachko NL, Zhao Y, et al. Exosomes as drug delivery vehicles for Parkinson disease therapy[J]. *J Control Release*, 2015, 207(6):18-30.
- [42] Zhang Y, Bi J, Huang J, et al. Exosome: A review of its classification, isolation techniques, storage, diagnostic and targeted therapy applications[J]. *Int J Nanomedicine*, 2020, 15(9):6917-6934.
- [43] Hajipour H, Farzadi L, Roshangar L, et al. A human chorionic gonadotropin(hCG) delivery platform using engineered uterine exosomes to improve endometrial receptivity[J]. *Life Sci*, 2021, 275(6):119351.
- [44] Faruqu FN, Xu L, Al-Jamal KT. Preparation of exosomes for siRNA delivery to cancer cells[J]. *J Vis Exp*, 2018, 142(12):10.3791/58814.
- [45] Wang J, Chen D, Ho EA. Challenges in the development and establishment of exosome-based drug delivery systems[J]. *J Control Release*, 2021, 329(1):894-906.
- [46] Guo P, Busatto S, Huang J, et al. A facile magnetic extrusion method for preparing endosome-derived vesicles for cancer drug delivery[J]. *Adv Funct Mater*, 2021, 31(44):2008326.
- [47] 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(5):35-44.
- [48] Kim M, Kim G, Hwang DW, et al. Delivery of high mobility group Box-1 siRNA using brain-targeting exosomes for ischemic stroke therapy[J]. *J Biomed Nanotechnol*, 2019, 15(12):2401-2412.
- [49] Tian T, Cao L, He C, et al. Targeted delivery of neural progenitor cell-derived extracellular vesicles for anti-inflammation after cerebral ischemia[J]. *Theranostics*, 2021, 11(13):6507-6521.
- [50] Kim HY, Kim TJ, Kang L, et al. Mesenchymal stem cell-derived magnetic extracellular nanovesicles for targeting and treatment of ischemic stroke[J]. *Biomaterials*, 2020, 243(6):119942.
- [51] Guo L, Huang Z, Huang L, et al. Surface-modified engineered exosomes attenuated cerebral ischemia/reperfusion injury by targeting the delivery of quercetin towards impaired neurons[J]. *J Nanobiotechnology*, 2021, 19(1):141.
- [52] Xin H, Katakowski M, Wang F, et al. MicroRNA cluster miR-17-92 Cluster in exosomes enhance neuroplasticity and functional recovery after stroke in rats[J]. *Stroke*, 2017, 48(3):747-753.
- [53] Xin H, Wang F, Li Y, et al. Secondary release of exosomes from astrocytes contributes to the increase in neural plasticity and improvement of functional recovery after stroke in rats treated with exosomes harvested from microRNA 133b-overexpressing multipotent mesenchymal stromal cells[J]. *Cell Transplant*, 2017, 26(2):243-257.
- [54] Zhang G, Zhu Z, Wang H, et al. Exosomes derived from human neural stem cells stimulated by interferon gamma improve therapeutic ability in ischemic stroke model[J]. *J Adv Res*, 2020, 24(5):435-445.
- [55] Huang X, Ding J, Li Y, et al. Exosomes derived from PEDF modified adipose-derived mesenchymal stem cells ameliorate cerebral ischemia-reperfusion injury by regulation of autophagy and apoptosis[J]. *Exp Cell Res*, 2018, 371(1):269-277.
- [56] Zhu ZH, Jia F, Ahmed W, et al. Neural stem cell-derived exosome as a nano-sized carrier for BDNF delivery to a rat model of ischemic stroke[J]. *Neural Regen Res*, 2023, 18(2):404-409.
- [57] Yang J, Wu S, Hou L, et al. Therapeutic effects of simultaneous delivery of nerve growth factor mRNA and protein via exosomes on cerebral ischemia[J]. *Mol Ther Nucleic Acids*, 2020, 21(9):512-522.
- [58] Lakhal S, Wood MJ. Exosome nanotechnology: an emerging paradigm shift in drug delivery: exploitation of exosome nanovesicles for systemic in vivo delivery of RNAi heralds new horizons for drug delivery across biological barriers[J]. *Bioessays*, 2011, 33(10):737-741.
- [59] Liu Y, Fu N, Su J, et al. Rapid enkephalin delivery using exosomes to promote neurons recovery in ischemic stroke by inhibiting neuronal p53/caspase-3[J]. *Biomed Res Int*, 2019, 2019(3):4273290.

引证本文: 杨悦悦, 马素娜, 陈净, 等. 外泌体及其工程化应用于缺血性脑卒中的研究进展[J]. 中风与神经疾病杂志, 2023, 40(7):667-672.