

外泌体作为 siRNA 递送载体的研究进展

刘淑兰, 周艺林, 周莉莉, 邹蔓姝, 夏新华^{*}(湖南中医药大学, 长沙 410208)

摘要: 小干扰 RNA(small interference RNA, siRNA)可以选择性靶向和下调致病基因, 在治疗人类疾病, 特别是恶性肿瘤方面具有很大前景。为了增强 siRNA 递送系统的靶向性和治疗效果, 许多载体已被广泛研究。外泌体存在于机体内源性系统, 具有较高的生物相容性、低免疫原性、主动靶向性等优点, 是一种很有潜力的 siRNA 递送载体。本文对外泌体 siRNA 递送系统的优势与不足、siRNA 载入外泌体的方式、外泌体介导 siRNA 靶向递送及应用等进行了综述, 旨在为外泌体作为一种新型靶向载体用于 siRNA 递送系统的研究提供参考。

关键词: 外泌体; siRNA; 递送载体; 转染

中图分类号: R945 文献标志码: A 文章编号: 1007-7693(2021)07-0880-07

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2021.07.020

引用本文: 刘淑兰, 周艺林, 周莉莉, 等. 外泌体作为 siRNA 递送载体的研究进展[J]. 中国现代应用药学, 2021, 38(7): 880-886.

Research Progress on Exosomes as siRNA Delivery Carriers

LIU Shulan, ZHOU Yilin, ZHOU Lili, ZOU Manshu, XIA Xinhua^{*}(Hunan University of Chinese Medicine, Changsha 410208, China)

ABSTRACT: siRNA shows great prospect in the treatment of human diseases, especially malignant tumors with its targeted selectivity and pathogenic gene down-regulation. In order to enhance the targeting and therapeutic effectiveness of siRNA delivery systems, many vectors have been extensively studied. Exosomes is a promising siRNA delivery carrier which exists in the endogenous system of the body, with advantages of high biocompatibility, low immunogenicity and active targeting, etc. In this paper, the advantages and disadvantages of the exosome siRNA delivery system, the way siRNA is loaded into exosomes, and the exosome-mediated targeted delivery of siRNA and its application are reviewed, aiming to provide reference for the study of exosomes as a new targeting carrier for siRNA delivery system.

KEYWORDS: exosomes; siRNA; delivery carriers; transfection

近年来, 通过小干扰 RNA(small interference RNA, siRNA)进行 RNA 干扰(RNA interference, RNAi), 因 siRNA 特异性高、作用强、不良反应小等优点而成为基因沉默的首选, 受到越来越多的关注。siRNA 是长度 19~25 个核苷酸不等的双链 RNA 分子, 双链 RNA 经 dicer 酶裂解后在胞内形成 siRNA, 经过适当处理后, siRNA 被合并到一个称为 RNA 诱导沉默复合体(RNA-induced silencing complex, RISC)的多蛋白复合物中^[1-2], RISC 与互补信使 RNA(messenger RNA, mRNA)序列结合, 导致 mRNA 序列降解, 从而抑制了目标 mRNA 翻译为蛋白质, 发挥基因沉默的作用^[3]。

siRNA 可用于靶向抗肿瘤, 也可用于治疗肺部疾病、感染和炎症、神经系统疾病以及自身免疫性疾病^[4-5]。由于裸 siRNA 的分子量较大, 且具有多阴离子性质, 被动摄取到细胞中会受到阻碍, 其传递效率一直是限制 siRNA 使用的主要因素; 此外, 裸 siRNA 的生物不稳定性、刺激免疫系统等问题也限制了其应用。为了解决这些问题, 有研究者将 siRNA 装入纳米载体中, 使其有效地传递并被摄取到目标细胞中。目前, 已被广泛研究的 siRNA 纳米递送载体包括脂质体、聚合物、无机物、siRNA 偶联物和 siRNA 适配体等^[6-9]。尽管 siRNA 递送系统研究取得了很大的进展(各 siRNA

基金项目: 国家自然科学基金项目(81573621); 湖南省科技计划项目(2017SK2122); 湖南省教育厅研究生教育创新工程和专业能力提升工程项目(CX20200756)

作者简介: 刘淑兰, 女, 硕士生 Tel: 13786138020 E-mail: 1792448655@qq.com ***通信作者:** 夏新华, 男, 博士, 教授 Tel: 13973131320 E-mail: xiaxinhua001@163.com

纳米递送载体的优缺点见表 1), 但由于受体细胞的免疫原性、血液的快速清除、载体本身的细胞毒性和较差的生物分布等缺陷, siRNA 的递送载体仍不能满足临床应用的要求。外泌体作为机体内源性载体, 具有高生物相容性、低免疫原性、固有的细胞靶向性等优势, 可弥补上述载体的缺陷, 有望成为 siRNA 递送的新型载体。

表 1 siRNA 递送载体的优缺点

Tab. 1 Advantages and disadvantages of siRNA delivery carriers

siRNA 递送载体	优点	缺点	参考文献
脂质体	生物相容性好, 易于制备, 较大的有效载荷	转染效率低、脂质体本身毒性、补体激活、触发免疫原性反应	[5-6]
聚合物	保护 siRNA 免受核酸酶降解	结构过于稳定、不易分解, 靶向性不足	[6-7]
无机物	可用于 siRNA 的持续缓慢释放	生物相容性差, 不能生物降解, 成药性低	[8]
siRNA 偶联物	提高 siRNA 在体外的转染效率	稳定性差、触发免疫原性反应	[5]
siRNA 适配体	与 siRNA 具有高亲和力、特异性和靶向性好	稳定性差、具有潜在毒性	[5]
外泌体	特异性靶向、毒性小、低免疫原性、生物相容性好、具有高通透性和滞留效应、能透过血脑屏障	批量生产来源不足、作用机制未明确、具有潜在毒性	[9-12]

1 外泌体及其作为 siRNA 递送载体的优势

1.1 外泌体

外泌体是活细胞吞噬异源物质后以出芽方式向内凹陷形成的含有多个小泡的多泡体, 再由多泡体与细胞膜融合而释放的小囊泡^[10], 是细胞外囊泡的一个亚型, 直径在 40~100 nm^[11]。外泌体包含大量的特定蛋白质、脂质、DNA、mRNA、非编码微小 RNA(microRNA, miRNA)和酶^[9-12], 负责介导其内容物的细胞间转移。外泌体膜的主要成分是蛋白质和脂质, 因此可以穿透许多生物膜, 进行细胞间物质与信息的交换。此外, 外泌体可由不同类型的细胞在体外分泌, 包括免疫细胞、肿瘤细胞、干细胞、造血细胞、神经元细胞和成纤维细胞等, 也广泛分布于各种体液中, 如唾液、腹水、心包积液、尿液、羊水、乳汁、脑脊液和血液等^[13-14]。最常见的治疗用外泌体来源包括间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSCs)、树突状细胞和人胚胎肾 293 细胞(human embryonic kidney 293 cells, HEK 293T)^[11-12]。

1.2 外泌体作为 siRNA 递送载体的优势

合成纳米载体(如脂质体)以其易于制备、产率高等优点成为目前研究较多的一类药物递送系统。然而, 脂质体在中和宿主免疫反应、生物系统稳定性、潜在的毒性和非特异性靶向等方面尚不能达到理想药物递送系统的标准, 从而阻碍了其临床应用。脂质体膜主要为磷脂和胆固醇, 而外泌体膜的成分不同于脂质体。外泌体是由一系列膜蛋白和表面脂质组成, 膜上特定的蛋白质和脂质有助于外泌体与靶细胞之间的有效融合, 并且外泌体具有内在的归巢特性, 在特异性靶向传递中发挥重要作用^[15]。虽然脂质体和外泌体都具有类似的双层磷脂, 但外泌体是一种生物纳米粒, 仅由细胞自身分泌的生物物质组成, 是 miRNA 和 mRNA 的天然载体, 可以最大限度地降低细胞毒性和免疫原性, 能够克服合成脂质体的局限性^[16]。脂质体在进入体内后可触发先天性免疫反应, 导致机体产生其装载的特异性 siRNA 的抗体, 而外泌体可通过抑制免疫细胞增殖和诱导 CD8⁺ T 细胞凋亡来逃避宿主的免疫激活^[17]。因此, 与脂质体相比, 外泌体具有更好的生物相容性和低免疫原性。另外, 由于外泌体的体积较小, 能够避免被单核吞噬细胞清除, 且在实体瘤部位具有高通透性和滞留效应^[17], 可实现药物在靶部位的聚集; 外泌体还能够透过血脑屏障进入脑内的血液循环^[18], 鼻内给药的方式可以使药物快速到达脑内病灶, 为无创伤治疗脑内疾病提供了可能。

外泌体的众多优势使其能够将 siRNA 顺利地携带到单靠 siRNA 本身所不能到达的器官, 并提高 siRNA 在体内的利用率。

2 外泌体 siRNA 的转染方式

如何高效地将 siRNA 转染到外泌体中是基于外泌体的 siRNA 治疗的关键步骤。通过物理或化学破坏外泌体膜, 随后将其重新密封, 可以将 siRNA 封装于外泌体内。以下主要介绍通过电穿孔、化学转染、孵育以及转染分泌外泌体的细胞等方法将 siRNA 载入外泌体。

2.1 电穿孔

用电穿孔方法在超声处理下给外泌体外部施加力度, 使其磷脂双分子层出现一个小孔, siRNA 可以沿着小孔进入其中。通过外部电场的作用而形成亲水孔, 电穿孔增加了细胞膜的通透性, 并允许化学物质、DNA、RNA 或药物进入细胞^[18-19]。

药物通过瞬时的小孔进入囊泡内部后,外泌体膜很快恢复完整。当疏水小分子自发地融合到外泌体时,电穿孔可将亲水性药物掺入细胞(如 siRNA、miRNA)^[20]。目前,电穿孔作为一种装载外源性 siRNA 的外泌体技术得到了广泛应用。

稳定性和靶向性差导致 RNA 修饰的组织工程血管(tissue engineering blood vessels, TEBVs)长期通畅性不佳。为了促进 MSCs 来源的外泌体上 klotho 蛋白的表达,Chen 等^[21]以聚乙烯亚胺包裹的金纳米粒(PEI/AuNP)为基础,通过逐层自组装构建了外泌体修饰的 TEBVs,然后通过电穿孔将腺苷激酶(adenosine kinase, ADK)siRNA 装载到外泌体中(klotho/ADK siRNA-外泌体)。流式细胞术结果表明, klotho/ADK siRNA-外泌体能够有效捕获循环内皮祖细胞(circulating endothelial progenitor cells, EPCs),且被捕获的 EPCs 可以将该外泌体内吞,并将其分解为 klotho 蛋白和 ADK siRNA。ADK siRNA 促进 EPCs 促血管生成因子的旁分泌,进一步促进内皮细胞的增殖和迁移。动物实验结果表明, klotho/ADK siRNA-外泌体修饰的 TEBVs 可维持通畅达 1 个月,且内皮化良好。Alvarez-Erviti 等^[22]通过电穿孔将 siRNA 载入树突状细胞外泌体中。为了提高其靶向性,他们以 BACE1(一种参与诱发阿尔茨海默病的蛋白质)为靶点,将外泌体膜蛋白 Lamp2b 与神经元特异性狂犬病毒糖蛋白(rabies viral glycoprotein, RVG)融合成为靶向外泌体。实验结果表明,该靶向外泌体递送 siRNA 能在体外快速传递到神经元细胞系(neuronal cells, Neuro2A),并且该靶向外泌体具有系统性递送 siRNA 的能力。通过静脉注射 RVG 靶向外泌体,甘油醛-3-磷酸脱氢酶(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH)siRNA 被成功递送到神经元、小胶质细胞和少突胶质细胞中。BACE1 基因在体内和体外均可通过负载 BACE1 siRNA 的 RVG 靶向外泌体,实现对阿尔茨海默病淀粉样前体蛋白裂解和淀粉样斑块形成基因的沉默(mRNA 下调 60%、蛋白下调 62%)。

尽管多项研究表明,通过电穿孔可将 siRNA 成功地载入外泌体,并将外泌体产物递送到靶器官(表 2),但使用电穿孔来装载治疗性 siRNA 仍然存在一些潜在缺点,包括依赖于直径大小的低装载效率、siRNA 的沉淀和降解,以及对外泌体制剂的 zeta 电位和胶体稳定性的不良影响^[23-24]。Kooijmans

等^[18]研究发现,加入乙二胺四乙酸(ethylene diamine tetraacetic acid, EDTA)可以显著减少外泌体与 siRNA 电穿孔后形成的不溶性 siRNA 聚集体。其他减少聚集体形成的措施包括使用具有导电聚合物电极的小杯和酸性柠檬酸盐电穿孔缓冲液,可比 EDTA 更有效地减少 siRNA 沉淀。然而,电穿孔后,siRNA 载入外泌体的数量仍然偏低。因此,进一步探索外泌体转染的新方法是非常必要的。

2.2 转染分泌外泌体的细胞

转染分泌外泌体的细胞,也称为间接转染法,是将分泌外泌体的细胞与 siRNA 放在一起混合培养,使细胞内含有所需 siRNA,从而分泌出含有所需 siRNA 外泌体的方法。该方法也可在供体细胞中过表达某一基因,或用特定药物处理细胞系,然后根据外泌体的生物发生过程将该细胞系缓缓包膜成囊泡。

据报道,白细胞介素 3 受体(interleukin-3 receptor, IL-3R)在慢性粒细胞白血病(chronic myeloid leukemia, CML)和急性髓系白血病(acute myeloid leukemia, AML)的母细胞上过表达,而在正常造血干细胞上低表达或不表达^[24]。因此 IL-3R 能够作为抗肿瘤药物递送的靶点。Bellavia 等^[25]将 HEK293T 与伊马替尼混合培养,HEK293T 作为供体细胞能产生靶向 IL-3R 的外泌体。该靶向外泌体能够将伊马替尼或含 BCR-ABL 基因(一种抗细胞凋亡的基因)的 siRNA 传递到 CML 细胞,克服肿瘤细胞的耐药性,对肿瘤生长的抑制作用也比单用伊马替尼更有效,且该体系能产生有效的基因沉默作用。

2.3 化学转染

基于化学试剂的外泌体转染方法,利用商业上可用的转染试剂,已被证明能有效地将外泌体与 siRNA 融合并传递到靶细胞。

Wahlgren 等^[26]使用 HiPerFect 转染试剂将丝裂原激活蛋白激酶 1(MAPK1)siRNA 载入外泌体,该外泌体能够有效地将 siRNA 传递给单核细胞和淋巴细胞,从而导致 MAPK1 的选择性沉默。在 Shtam 等^[27]的研究中,通过化学转染将 RAD51、RAD52 siRNAs 与 lipofectamine 融合到外泌体中,并通过外泌体给药,在肿瘤细胞中产生了 RAD51 基因沉默效应。然而,化学转染有几个限制,包括转染试剂少且不能通用,不能从化学转染的胶束中分离出外泌体囊泡。此外,外泌体是否能向受体细

胞递送外源性 siRNA 也存在质疑^[28]。因此,需要进一步的研究来探索新的先进的外泌体样品纯化技术以及替代的装载工具。

2.4 孵育

通过在特定温度下将外泌体与 siRNA 混合静置一定时间让其充分反应也能实现 siRNA 外泌体转染。Banizs 等^[29]通过超速离心从 Hela 细胞和腹水中分离外泌体,将用荧光染料 Alexa flour 488 (AF488)标记的 siRNA 与 lipofectamine 混合,并在加热条件下与外泌体孵育 30 min。转染后,将混合物清洗 3~5 次,超滤,将载 siRNA 的外泌体与受体细胞共培养 24 h,从而将外源性 siRNA 转移到受体细胞中^[29]。Didiot 等^[30]使用来自胶质母细胞瘤的外泌体,在亨廷顿(Huntingtin)小鼠模型中预先载入疏水修饰的 siRNA(hydrophobically modified small interfering RNAs, hsiRNA),观察到 hsiRNA 在共孵育时可以有效地装载到外泌体中,且不改变囊泡的大小分布或完整性。载有可靶向 Huntingtin mRNA 的 hsiRNA 的外泌体可被小鼠原代皮层神经元有效内化,并促进 Huntingtin mRNA 和蛋白的剂量依赖性沉默。将载 hsiRNA 的外泌体递送到大脑广泛分布并发挥治疗作用,有望进一步推动亨廷顿氏舞蹈病和其他神经退行性疾病治疗方法的发展。

3 外泌体介导 siRNA 靶向递送

外泌体不仅可以作为载体荷载 siRNA,还可以经过化学修饰等方法构建靶向外泌体,使其增强对靶细胞的亲和力,降低与正常组织细胞的亲和性,从而增强疗效、减少不良反应。构建靶向外泌体的方法有 3 种:①在外泌体的表面添加靶向肽;②用靶向肽以外的其他配体修饰外泌体;③靶向性处理外泌体,使其表达肿瘤相关抗原。

3.1 靶向肽

在外泌体的表面添加靶向肽,以此作为配体,与细胞表面的相应受体特异性结合,是实现外泌体靶向运输的重要方式之一。中枢神经系统特异性狂犬病病毒糖蛋白(RVG 肽)作为外泌体表面 Lamp2b 蛋白的嵌合物,可融合外泌体靶向脑内乙酰胆碱受体^[22]。RVG 靶向外泌体可以通过血脑屏障递送阿片受体 μ (MOR)siRNA,降低 MOR 的表达水平,用于治疗吗啡成瘾^[22]。tLyp-1 肽(氨基酸序列为 CGNKRTR)是新报道的七肽^[31],它是选择性靶向细胞表面跨膜糖蛋白 neuropilin1(NRP1)和

neuropilin2(NRP2)的配体,NRP1 和 NRP2 在包括非小细胞肺癌在内的肿瘤组织中均有高表达,是抗肿瘤药物递送系统的受体靶点。tLyp-1 作为一种肿瘤归巢穿膜肽,不仅能靶向肿瘤,还能穿透肿瘤血管和间质而深入肿瘤。Bai 等^[31]通过基因重组工程构建了一种新的靶向肽 tLyp-1 修饰的外泌体,能有效地将 siRNA 递送到肺癌及其干细胞,为未来癌症的治疗提供了一种很有前景的基因递送平台。

3.2 其他配体修饰外泌体

叶酸(folic acid, FA)受体(FA receptor, FR)是一种在多种肿瘤细胞上过表达的细胞表面糖蛋白,但其在正常细胞上低表达或不表达。因此 FA 常作为配体用于多种癌症(包括乳腺癌、肺癌、卵巢癌、结直肠癌、头颈癌等)治疗药物的靶向递送^[32]。近年,有研究者用 FA 修饰载有 siRNA 的外泌体,发现其经由 FR 介导可直接将 siRNA 递送入细胞质,而不被核内体或溶酶体捕获,从而明显增强 siRNA 的功能。Zheng 等^[33]用 FA 修饰的外泌体装载 survivin siRNA,形成 FA/外泌体/survivin siRNA 复合物,发现外泌体在与 FR 结合后与细胞膜融合,从而有效地将载荷的 survivin siRNA 释放到细胞质中。此外,在 KB 细胞(人口腔表皮样癌细胞)衍生的肿瘤异种移植小鼠模型上,研究人员对功能化的 FA/外泌体复合物进行了试验。结果表明,与不含外泌体的 FA-survivin siRNA 对照组相比,FA/外泌体/survivin siRNA 显著抑制了体内肿瘤细胞的生长,且 FA/外泌体/survivin siRNA 在体内和体外都表现出显著的基因沉默效果。

3.3 靶向性处理外泌体,使其表达肿瘤相关抗原

通过基因工程产生的细胞、配体可以与外泌体表面蛋白或脂质(如 Lamp2b 和胆固醇)融合表达^[34-35],以靶向癌细胞受体。设计连接蛋白重复蛋白(designed ankyrin repeat proteins, DARPins)是一类合成肽,他们与靶蛋白具有高亲和力和特异性。Limoni 等^[34]在研究中采用人类表皮生长因子受体(human epidermal growth factor receptor, HER2)特异性 DARPins 来生产 HER2 靶向外泌体,这些靶向 HER2 的外泌体被用于向 HER2 过表达的乳腺癌细胞递送 siRNA,通过携带 Lamp2b-DARPins G3 嵌合基因的慢病毒载体对 HEK293T 细胞进行了转染。他们选择稳定表达表面蛋白的细胞,从培养基中分离出这些细胞产生的外泌体进行表征,然后装载 siRNA,以便随后递送到 SKBR3

细胞。研究发现 HEK293T 稳定地在外泌体表面产生 DARPin G3, 这些外泌体可以特异性地与 HER2/Neu 结合, 能够将针对 TPD52 基因的 siRNA 分子传递到 SKBR3 细胞系中, 下调基因表达高达 70%^[35]。这一方法有望促进基因和药物递送到 HER2 肿瘤细胞, 为基因治疗和药物递送提供一种新的选择。

4 外泌体介导 siRNA 递送的应用研究

结合外泌体与 siRNA 的优势, 在不同的疾病中, 利用外泌体成功递送 siRNA 和沉默靶向基因的例子有很多。Aqil 等^[36]研究发现, 外泌体可装载 VEGF、EGFR、AKT、MAPK、KRAS 等特异性基因的 siRNA, 且能在不同的癌细胞株中成功表达, 并表现出 2~10 倍的基因敲除率。通过设计靶向外泌体, 功能性 siRNA 可用于肿瘤靶向治疗^[37-39], 且无其他载体的毒性和免疫原性, 在血浆中更稳定。此外, 由于外泌体能够穿透血脑屏障^[40], 外泌体载 siRNA 在治疗中枢神经系统疾病方面也具有巨大的潜力^[30,41-43]。近年来有关外泌体介导 siRNA 递送的一些应用研究见表 2。

5 外泌体作为 siRNA 递送载体面临的挑战

外泌体由于其高生物相容性、低免疫原性、固有的细胞靶向性等优势, 在 siRNA 靶向递送中越来越具有吸引力。然而, 外泌体作为一种新型 siRNA 递送载体也面临着诸多挑战: ①不同来源

的外泌体功能不同, 导致其分离和纯化方法难以标准化, 限制了其临床批量生产; 从不同细胞中获得的外泌体数量差异显著, 因此在之后的研究中有必要对不同细胞来源的外泌体进行量化和表征; 此外, 在进行体内研究时, 也应特别注意外泌体来源的选择, 以避免免疫原性。②在外泌体的加工和修饰过程中, 供体细胞和外泌体的变化可能会影响外泌体的含量或蛋白质组成^[44-45], 从而影响外泌体的生物活性和功效。③受体细胞摄取外泌体可通过受体介导的内吞作用、脂质流介导的内吞作用、直接膜融合或大胞饮作用实现^[46], 但传统的外泌体转染外源性 siRNA 的方法存在如 siRNA 聚集、对细胞的毒性以及实验成本高等局限性, 导致现有研究中 siRNA 的包封率不及传统脂质体载体高(Faruqu 等^[47]制备的 HEK-293T 外泌体 siRNA 包封率仅为 10%~20%), 因此寻找一种安全有效的转染方法仍具有挑战性。目前对于外泌体潜在的不良反应研究尚为不足, 外泌体的生物发生、转运和吸收机制也尚未明确, 因此外泌体在临床的疗效和毒性还需要更多的体内研究。

6 小结与展望

外泌体具有很强的生物相容性, 具有重要的临床应用价值, 为药物递送开辟了新的领域。

由于缺乏临床数据, 现在还无法预测外泌体载 siRNA 的安全性和有效性, 但外泌体有很大潜

表 2 外泌体介导 siRNA 递送的应用

Tab. 2 Application of exosome delivery of siRNA

外泌体来源	相关检测基因	研究内容	转染方法	参考文献
MSCs	klotho/ADK siRNA 外泌体	外泌体修饰的组织工程血管用于内皮祖细胞捕获和靶向 siRNA 传递	电穿孔	[21]
自体树突状细胞	Lamp2b	通过系统注射靶向外泌体将 siRNA 传递到小鼠大脑	电穿孔	[22]
HEK293T	BCR-ABL siRNA	白介素-3 受体靶向外泌体抑制体内慢性粒细胞白血病细胞的生长	化学转染	[25]
血浆	CD63、CD81 和 CD9	血浆外泌体向单核细胞和淋巴细胞传递外源性 siRNA	电穿孔	[26]
脑脊液	hsRNAs	外泌体介导的疏水性修饰的 siRNA 的递送, 用于亨廷顿 mRNA 沉默	孵育	[30]
HEK293T	siRNA tLyp-1 外泌体	工程靶向 tLyp-1 外泌体作为基因治疗载体, 有效地将 siRNA 导入肺癌细胞	电穿孔	[31]
HEK293T	FA-siRNA 外泌体	叶酸修饰的外泌体介导了 siRNA 的胞质传递, 从而避免了核小体的捕获	化学转染	[33]
内皮细胞	CD-9、CD-63	外泌体作为 siRNA 载体的体外评价	电穿孔	[36]
HEK293T 和 MSCs	PLK-1 siRNA	外泌体携带的 siRNA 沉默膀胱癌中的 PLK-1	电穿孔	[37]
自体乳腺癌细胞	CBSA/siS100A4/外泌体	外泌体介导的 siRNA 递送抑制乳腺癌术后转移	孵育	[38]
神经母细胞瘤细胞	HSP27 siRNA	用外泌体标记的 Hsp27 siRNA 治疗人神经母细胞瘤, 降低了成熟神经元的分化率	孵育	[39]
HEK293T	阿片受体 Mu siRNA	靶向外泌体介导的阿片受体 Mu siRNA 递送治疗吗啡复发	化学转染	[41]
HEK293T	外泌体/TRPP2/siRNA	外泌体传递 TRPP2 siRNA 抑制 FaDu 细胞的上皮间质转化	孵育	[42]
脑内皮细胞	VEGF siRNA	用天然脑内皮细胞分泌的外泌体纳米囊泡传递 siRNA, 抑制斑马鱼血管内皮生长因子治疗脑瘤	化学转染	[43]
血清	CD31、CD45	外泌体介导 siRNA 递送用于治疗炎症性肺反应	孵育	[44]
上皮 MCF-10A	CDK4	功能性外泌体模拟 siRNA 向癌症递送的体外和体内评价	电穿孔	[45]

力成为 siRNA 和基因治疗的新型载体。人体细胞培养是目前外泌体的主要来源之一,但其制备方法和规模化仍具有一定的挑战性。为了扩大生产规模,包括使用生物反应器^[48]在内的一些策略已经制定出来,但是从经济上讲,成本/产量仍然不适用于临床应用,这一问题或许可以从替代来源(包括尿液、牛奶、植物)中获取外泌体或类似外泌体的囊泡予以解决^[49]。对于外泌体介导的 siRNA 递送的临床应用,还需要优化外泌体的生产和分离方法,以获得大小适宜、分布均匀的外泌体群;此外,通过外泌体递送 siRNA 的剂量也应根据外泌体的大小和数量以及装载效率进行优化。目前,外泌体载 siRNA 的研究仅仅停留在实验室阶段,将其应用于临床还需要更进一步的研究。

REFERENCES

- [1] CHEN Z, KRISHNAMACHARY B, PACHECHO-TORRES J, et al. Theranostic small interfering RNA nanoparticles in cancer precision nanomedicine[J]. Wiley Interdiscip Rev Nanomed Nanobiotechnol, 2020, 12(2): e1595. Doi: 10.1002/wnan.1595.
- [2] ZHANG P, AN K, DUAN X, et al. Recent advances in siRNA delivery for cancer therapy using smart nanocarriers[J]. Drug Discov Today, 2018, 23(4): 900-911.
- [3] ZHENG M, TAO W, ZOU Y, et al. Nanotechnology-based strategies for siRNA brain delivery for disease therapy[J]. Trends Biotechnol, 2018, 36(5): 562-575.
- [4] LEIRO V, SANTOS S D, PEGO A P. Delivering siRNA with dendrimers: *In vivo* applications[J]. Curr Gene Ther, 2017, 17(2): 105-119.
- [5] AIGNER A, KÖGEL D. Nanoparticle/siRNA-based therapy strategies in glioma: Which nanoparticles, which siRNAs?[J]. Nanomedicine: Lond, 2018, 13(1): 89-103.
- [6] DRAGONI L, FERRARI R, LUPI M, et al. Small interfering RNA delivery through positively charged polymer nanoparticles[J]. Nanotechnology, 2016, 27(12): 125102. Doi: 10.1088/0957-4484/27/12/125102.
- [7] TIAN G, PAN R, ZHANG B, et al. Liver-targeted combination therapy basing on glycyrrhizic acid-modified DSPE-PEG-PEI nanoparticles for Co-delivery of doxorubicin and bcl-2 siRNA[J]. Front Pharmacol, 2019(10): 4. Doi: 10.3389/fphar.2019.00004.
- [8] PANDAY R, ABDALLA A M E, YU M, et al. Functionally modified magnetic nanoparticles for effective siRNA delivery to prostate cancer cells *in vitro*[J]. J Biomater Appl, 2020, 34(7): 952-964.
- [9] PARASHAR D, RAJENDRAN V, SHUKLA R, et al. Lipid-based nanocarriers for delivery of small interfering RNA for therapeutic use[J]. Eur J Pharm Sci, 2020(142): 105159. Doi: 10.1016/j.ejps.2019.105159.
- [10] SYN N L, WANG L, CHOW E K, et al. Exosomes in cancer nanomedicine and immunotherapy: Prospects and challenges [J]. Trends Biotechnol, 2017, 35(7): 665-676.
- [11] SHAHABIPOUR F, BARATI N, JOHNSTON T P, et al. Exosomes: Nanoparticulate tools for RNA interference and drug delivery[J]. J Cell Physiol, 2017, 232(7): 1660-1668.
- [12] DAS C K, JENA B C, BANERJEE I, et al. Exosome as a novel shuttle for delivery of therapeutics across biological barriers[J]. Mol Pharm, 2019, 16(1): 24-40.
- [13] KUMAR L, VERMA S, VAIDYA B, et al. Exosomes: natural carriers for siRNA delivery[J]. Curr Pharm Des, 2015, 21(31): 4556-4565.
- [14] EL-ANDALOUSSI S, LEE Y, LAKHAL-LITTLETON S, et al. Exosome-mediated delivery of siRNA *in vitro* and *in vivo*[J]. Nat Protoc, 2012, 7(12): 2112-2126.
- [15] LUANX, SANSANAPHONGPRICHA K, MYERS I, et al. Engineering exosomes as refined biological nanoplatforams for drug delivery[J]. Acta Pharmacol Sin(中国药理学报), 2017, 38(6): 754-763.
- [16] LU M, XING H, XUN Z, et al. Exosome-based small RNA delivery: Progress and prospects[J]. Asian J Pharm Sci, 2018, 13(1): 1-11.
- [17] LU M, ZHAO X, XING H, et al. Comparison of exosome-mimicking liposomes with conventional liposomes for intracellular delivery of siRNA[J]. Int J Pharm, 2018, 550(1/2): 100-113.
- [18] KOOIJMANS S A A, STREMERSCHE 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.
- [19] SHTAM T A, KOVALEV R A, VARFOLOMEEVA E Y, et al. Exosomes are natural carriers of exogenous siRNA to human cells *in vitro*[J]. Cell Commun Signal, 2013, 11(1): 1-10.
- [20] WANG J H, ZHENG Y J, ZHAO M. Exosome-based cancer therapy: Implication for targeting cancer stem cells[J]. Front Pharmacol, 2017(7): 533. Doi: 10.3389/fphar.2016.00533.
- [21] CHEN W, YANG M, BAI J, et al. Exosome-modified tissue engineered blood vessel for endothelial progenitor cell capture and targeted siRNA delivery[J]. Macromol Biosci, 2018, 18(2). Doi: 10.1002/mabi.201700242.
- [22] ALVAREZ-ERVITI L, SEOW Y, YIN H F, et al. Delivery of siRNA to the mouse brain by systemic injection of targeted exosomes[J]. Nat Biotechnol, 2011, 29(4): 341-345.
- [23] SUBHAN M A, ATTIA S A, TORCHILIN V P. Advances in siRNA delivery strategies for the treatment of MDR cancer[J]. Life Sci, 2021(274): 119337. Doi.org/10.1016/j.lfs.2021.119337.
- [24] LU M, ZHAO X, XING H, et al. Cell-free synthesis of connexin 43-integrated exosome-mimetic nanoparticles for siRNA delivery[J]. Acta Biomater, 2019(96): 517-536.
- [25] BELLAVIA D, RAIMONDO S, CALABRESE G, et al. Interleukin 3- receptor targeted exosomes inhibit *in vitro* and *in vivo* chronic myelogenous leukemia cell growth[J].

- Theranostics, 2017, 7(5): 1333-1345.
- [26] WAHLGREN J, KARLSON T D L, BRISSLERT M, et al. Plasma exosomes can deliver exogenous short interfering RNA to monocytes and lymphocytes[J]. Nucleic Acids Res, 2012, 40(17): e130. Doi: 10.1093/nar/gks463.
 - [27] SHTAM T A, KOVALEV R A, VARFOLOMEEVA E Y, et al. Exosomes are natural carriers of exogenous siRNA to human cells *in vitro*[J]. Cell Commun Signal, 2013, 11: 88. Doi: 10.1186/1478-811X-11-88.
 - [28] LI Z, WANG H, YIN H, et al. Arrowtail RNA for ligand display on ginger exosome-like nanovesicles to systemic deliver siRNA for cancer suppression[J]. Sci Rep, 2018, 8(1): 14644. Doi: 10.1038/s41598-018-32953-7.
 - [29] BANIZS A B, HUANG T, DRYDEN K, et al. *In vitro* evaluation of endothelial exosomes as carriers for small interfering ribonucleic acid delivery[J]. Int J Nanomedicine, 2014(9): 4223-4230.
 - [30] DIDOT M C, HALL L M, COLES A H, et al. Exosome-mediated delivery of hydrophobically modified siRNA for huntingtin mRNA silencing[J]. Mol Ther, 2016, 24(10): 1836-1847.
 - [31] 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.
 - [32] JURCZYK M, JELONEK K, MUSIAL-KULIK M, et al. Single-versus dual-targeted nanoparticles with folic acid and biotin for anticancer drug delivery[J]. Pharmaceutics, 2021, 13(3): 326. Doi:10.3390/pharmaceutics13030326.
 - [33] ZHENG Z, LI Z, XU C, et al. Folate-displaying exosome mediated cytosolic delivery of siRNA avoiding endosome trapping[J]. J Control Release, 2019(311/312): 43-49.
 - [34] LIMONI S K, MOGHADAM M F, MOAZZENI S M, et al. Engineered exosomes for targeted transfer of siRNA to HER2 positive breast cancer cells[J]. Appl Biochem Biotechnol, 2019, 187(1): 352-364.
 - [35] REN J, DING L, ZHANG D Y, et al. Carcinoma-associated fibroblasts promote the stemness and chemoresistance of colorectal cancer by transferring exosomal lncRNA H19[J]. Theranostics, 2018, 8(14): 3932-3948.
 - [36] AQIL F, MUNAGALA R, JEYABALAN J, et al. Milk exosomes-Natural nanoparticles for siRNA delivery[J]. Cancer Lett, 2019(449): 186-195.
 - [37] GRECO K A, FRANZEN C A, FOREMAN K E, et al. PLK-1 silencing in bladder cancer by siRNA delivered with exosomes[J]. Urology, 2016(91): 241.e1-e7.
 - [38] ZHAO L, GU C, GAN Y, et al. Exosome-mediated siRNA delivery to suppress postoperative breast cancer metastasis[J]. J Control Release, 2020(318): 1-15.
 - [39] WANG C, CHEN L, HUANG Y, et al. Exosome-delivered TRPP2 siRNA inhibits the epithelial-mesenchymal transition of FaDu cells[J]. Oncol Lett, 2019, 17(2): 1953-1961.
 - [40] REYNOLDS J L, MAHAJAN S D. Transmigration of tetraspanin 2(Tspan2) siRNA via microglia derived exosomes across the blood brain barrier modifies the production of immune mediators by microglia cells[J]. J Neuroimmune Pharmacol, 2020, 15(3): 554-563.
 - [41] LIU Y, LI D, LIU Z, et al. Targeted exosome-mediated delivery of opioid receptor Mu siRNA for the treatment of morphine relapse[J]. Sci Rep, 2015(5): 17543. Doi: 10.1038/srep17543.
 - [42] DE RIVERO VACCARI J P, BRAND F, ADAMCZAK S, et al. Exosome-mediated inflammasome signaling after central nervous system injury[J]. J Neurochem, 2016, 136(Suppl 1): 39-48.
 - [43] YANG T, FOGARTY B, LAFORGE B, et al. Delivery of small interfering RNA to inhibit vascular endothelial growth factor in zebrafish using natural brain endothelial cell-secreted exosome nanovesicles for the treatment of brain cancer[J]. Aaps J, 2017, 19(2): 475-486.
 - [44] JU Z, MA J, WANG C, et al. Exosomes from iPSCs delivering siRNA attenuate intracellular adhesion molecule-1 expression and neutrophils adhesion in pulmonary microvascular endothelial cells[J]. Inflammation, 2017, 40(2): 486-496.
 - [45] ZHAO G Y, JING X, JING Z, et al. Functional exosome-mimic for delivery of siRNA to cancer: *in vitro* and *in vivo* evaluation[J]. J Control Release, 2016(243): 160-171.
 - [46] LI C, GUO F, WANG X, et al. Exosome-based targeted RNA delivery for immune tolerance induction in skin transplantation [J]. J Biomed Mater Res A, 2020, 108(7): 1493-1500.
 - [47] FARUQU F N, XU L, AL-JAMAL K T. Preparation of exosomes for siRNA delivery to cancer cells[J]. J Vis Exp, 2018(142). Doi:10.3791/58814.
 - [48] TAO H, XU H, ZUO L, et al. Exosomes-coated bcl-2 siRNA inhibits the growth of digestive system tumors both *in vitro* and *in vivo*[J]. Int J Biol Macromol, 2020(161): 470-480.
 - [49] ZHANG Q, ZHANG H, NING T, et al. Exosome-delivered c-met siRNA could reverse chemoresistance to cisplatin in gastric cancer[J]. Int J Nanomedicine, 2020(15): 2323-2335.

收稿日期: 2020-04-19

(本文责编: 蔡珊珊)