

血小板来源外泌体作为药物递送载体的研究进展



龙泽纯¹, 刘 阳², 谢向阳³, 刘 辉^{1, 2, 3}

1. 湖北医药学院药学院 (湖北十堰 442000)
2. 武汉科技大学医学院 (武汉 430065)
3. 中部战区总医院医疗保障中心 (武汉 430070)

【摘要】血小板来源的外泌体 (PEV) 是血小板释放的纳米级细胞外囊泡亚群。研究表明, PEV 在炎症反应、血管生成和癌症进展等多种生理及病理过程中发挥着重要的调控作用。得益于其纳米级尺寸特性, PEV 具有显著的高渗透长滞留效应, 能够有效穿透血管屏障并在疾病靶部位特异性聚集, 这一特性使其成为极具潜力的药物靶向递送载体。然而, 目前 PEV 的安全性评价体系尚未完善, 其生产工艺和质量控制标准仍难以满足药品监管要求。如何在大规模生产时保障 PEV 的质量均一性和稳定性是下一步研发需要克服的重点。本文系统综述了 PEV 的生物学功能、载药制备方法及其在靶向给药领域的最新研究进展, 以为新型纳米药物载体的开发提供理论依据和实践参考。

【关键词】血小板源性外泌体; 外泌体; 药物递送系统; 药物靶向性

【中图分类号】 R951

【文献标识码】 A

Research progress of platelet-derived exosomes as drug delivery vehicles

LONG Zechun¹, LIU Yang², XIE Xiangyang³, LIU Hui^{1,2,3}

1. School of Pharmaceutical Sciences, Hubei University of Medicine, Shiyan 442000, Hubei Province, China

2. School of Medicine, Wuhan University of Science and Technology, Wuhan 430065, China

3. Medical support center, General Hospital of Central Theater Command of PLA, Wuhan 430070, China

Corresponding author: LIU Hui, Email: pharmacyman@163.com

【Abstract】 Platelet-derived exosomes (PEVs) are a subpopulation of nanoscale extracellular vesicles released by platelets. Studies have shown that PEVs play an important regulatory role in a variety of physiological and pathological processes, such as inflammatory response, angiogenesis, and cancer progression. Thanks to its nanoscale size characteristics, PEVs have a significant high permeability and long retention effect, can effectively penetrate the vascular barrier and specifically aggregate at the target site of the disease, which makes it a highly potential drug targeted delivery carrier. However, the current safety evaluation system of PEVs has not been perfected, and its production process and quality control standards are still difficult to meet drug regulatory requirements. How to ensure the quality uniformity and stability of PEVs during large-scale production is the focus of the next step of research and development. This article systematically reviews the biological functions of PEVs, drug loading preparation methods, and the latest research progress in the field of targeted drug delivery, in order to provide a theoretical basis and practical reference for the development of new nano drug carriers.

【Keywords】 Platelet-derived exosomes; Exosomes; Drug delivery system; Drug targeting

DOI: 10.12173/j.issn.2097-4922.202412046

基金项目: 湖北省“楚天英才计划”项目 [鄂卫发(2024)1号]

通信作者: 刘辉, 博士, 主任药师, Email: pharmacyman@163.com

多数细胞都可以分泌细胞外囊泡 (extracellular vesicle, EV), 这些外囊泡可装载不同的物质, 如纳米级的蛋白质和核糖核酸 (ribonucleic acid, RNA) 等^[1]。细胞外囊泡的免疫原性低, 具有纳米级尺寸而能穿越大多数生物屏障。根据外囊泡的大小, 可将其分为3类, 从大至小依次是凋亡小体 (500~5 000 nm)、微囊泡 (100~500 nm) 和外泌体 (40~100 nm)^[2]。来源于特定细胞的外囊泡, 其具有脂质双分子层结构和来源于其母细胞的特定蛋白质。例如, 从癌细胞中分离所得的外囊泡含有其对应的肿瘤抗原; 来自红细胞的外囊泡则含有 CD47, 使其具有长循环的特性^[3]。

血小板来源的外泌体 (platelet-derived extracellular vesicles, PEV) 于 1965 年首次发现。PEV 具有多种生物学功能, 参与炎症、免疫系统的反应并和肿瘤的发生发展进程相关。血液中 50% 以上的外泌体来自血小板和巨核细胞, PEV 是体内数量最多的外泌体。活化的血小板中释放出来的外泌体, 其膜上带有其母体血小板的 CD41、P-选择素和其他血小板特异性蛋白^[4]。在这些特异性蛋白的作用下, PEV 可以协助血小板的止血, 并参与免疫调节和肿瘤的发生发展^[5]。此外, PEV 还可以介导不同细胞之间发生相互作用 (图 1), 这些被介导的细胞可以是免疫细胞也可以是非免疫细胞。

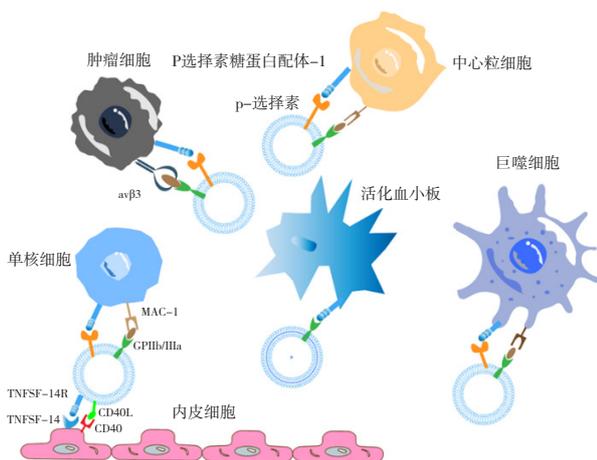


图1 PEV与其他细胞的相互作用

Figure 1. Interactions between PEV and other cells

PEV 来源于血小板, 具有母体血小板所携带的特异性蛋白, 有主动靶向受损血管和活化内皮细胞的能力, 能够在炎症性疾病和肿瘤发生发展过程发挥重要作用。同时, 因其纳米级的尺寸具有高渗透滞留效应, 易于穿透血管在疾病靶部

位聚集^[6]。此外, PEV 具有较低的免疫原性, 这为其异体输注应用提供了可能。与其他来源的外泌体相比, PEV 在规模化制备方面具有明显优势。基于上述特性, PEV 作为一种新型药物递送载体, 在靶向给药领域展现出广阔的应用前景。本文将系统阐述 PEV 的生物学功能及其载药制备方法, 并重点综述其在药物递送领域的最新研究进展。

1 生物学特性

PEV 是由活化的血小板分泌的由膜包裹的非均匀纳米颗粒, 这些颗粒可以与其他细胞进行通信, 从而调节这些细胞的功能。

1.1 PEV的来源和释放

凝血功能的启动通常伴随着血小板的活化。血小板主要通过两种途径激活^[7]: G 蛋白偶联受体和免疫受体酪氨酸激活信号通路。一些经典激动剂, 如凝血酶、二磷酸腺苷等可通过第 1 种途径激活血小板。激活的血小板释放出大量的外泌体与其他细胞 (如其他血小板、内皮细胞、单核细胞和中性粒细胞等) 进行通信, 从而调节免疫细胞和下游细胞的功能。此外血小板的程序性死亡或凋亡也可产生和释放外泌体。

PEV 的具体释放机理目前尚不明确, 可大致地将其分为两种方式, 一种是从血小板分泌的多囊泡内体和 α 颗粒中释放, 另一种是直接从血小板的细胞质膜上释放^[8]。血小板激活时, 血小板膜凹陷包裹部分膜蛋白, 成为早期的内质体。随后, 内质体选择性地装载蛋白质、核酸等其他物质。随着这些囊泡的聚集融合, 内质体会逐渐转化为多囊泡内体。当多囊泡内体与血小板膜融合时, 多囊泡内体含有的小囊泡则可从血小板中释放出来, 形成外泌体。另一种释放机制中, 血小板激活后, 其内的细胞质 Ca^{2+} 浓度增加, 导致细胞骨架重组, 细胞膜不对称性丧失和裂解, 最终释放出外泌体^[9]。血小板程序性死亡时, 膜裂解也可以直接释放外泌体^[10]。

1.2 PEV的结构和组成

与其他大多数外泌体类似, PEV 的成份具有异质性, 其内包含的物质通常并不相同。PEV 的外层通常由来源于血小板膜的磷脂双层所构成, 其内包裹着血小板的 RNAs、蛋白质和脂质。在 PEV 表面可检测到外泌体的特有的蛋白, 如 CD9、CD63 和 CD81。大多 PEV 表面还发现有

CD41 和 P-选择素的存在^[11]。部分 PEV 表面存在有磷脂酰丝氨酸^[12]。血小板还可将 mRNA 和非编码 RNA 包装进 PEV 内,以便与其他细胞进行相互调控^[13]。此外,在一些 PEV 内存在着趋化因子、细胞因子、生长因子和线粒体等(图 2)。

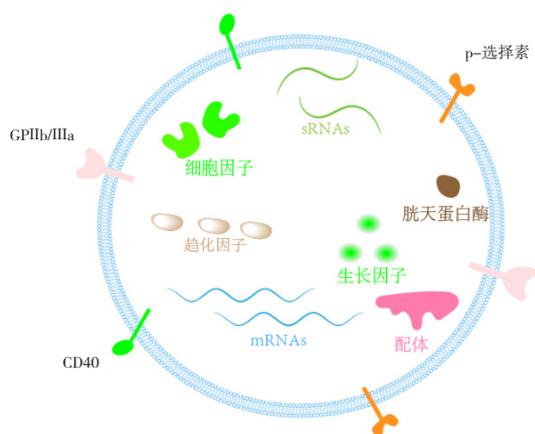


图2 PEV的结构示意图

Figure 2. Schematic diagram of the structure of PEV

1.3 功能

PEV 从血小板中释放出来后,进入循环系统,会与各种细胞进行相互作用。研究表明,PEVs 与内皮细胞、间充质干细胞、平滑肌细胞、血小板和免疫细胞相互作用,调节这些细胞的功能^[14]。Antich-Rosselló 等^[15]研究表明,在骨再生方面,PEV 可以诱导间充质干细胞向成骨分化。PEVs 还可以通过 CD40 和 P-选择素的相互作用诱导平滑肌细胞朝向促炎表型^[16]。Miyazawa 等^[17]研究报告,在诱导凝血酶下,在血小板中衍生的 PEVs 可以通过增加紧密连接蛋白和 VE-钙黏蛋白的表

达来增强内皮的通透性。此外,研究显示,PEVs 还能通过其表面表达的还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸氧化酶生成超氧化物,从而激活血小板并调节其功能^[18]。

2 PEV的提取

为了便于大量获取 PEV,研究人员用凝血酶或氯化钙刺激血小板来模拟其生物合成。PEV 不仅可以通过生物化学刺激产生,也可通过物理刺激产生。研究人员通过对血小板浓缩物进行三次冻融循环来制备 PEV^[19]。具体方法是将血小板浓缩物(每单位含有来自 5 名捐献者的血小板)在 -20°C 条件下进行冷冻,收集 15~16 个单位的水小板浓缩物后,将其在 37°C 条件下轻轻搅拌解冻,集中到无菌瓶中,混合并等分到 50 mL 试管中,此时第 1 个冻融循环已经完成;然后将样品使用液氮进行振荡冷冻,促使血小板膜的进一步破坏和释放其中包含的成分;为了使膜融合并形成新的囊泡,将样品在 37°C 下轻轻搅拌解冻 30 min,此时完成第 2 个冻融循环;再次使用液氮进行第 3 次冲击冷冻,并保存在 -80°C 条件下。使用前,将样品在 37°C 下轻轻搅拌解冻 30 min,完成第 3 个冻融循环。这种方法得到的 PEV 活性高,但其内包裹的蛋白质等物质是否与生物化学刺激得到的 PEV 一致尚不明确。

目前,从血液中提取 PEV 的方法主要有超速离心法、免疫亲和捕获法、超滤法、试剂盒法、PEG 沉淀法等(表 1),其中以超速离心法最为常用。

表 1 PEV的常用提取分离方法

Table 1. Common extraction and separation methods of PEV

方法名称	分离原理	所用试剂	优点	缺点
超速离心 ^[20]	通过逐步离心去除杂质,最后超速离心得到外泌体	磷酸盐缓冲液(PBS),离心缓冲液,二硫苏糖醇(DTT)	成本低,外泌体纯度较高	耗时长,仪器要求高,操作不当可能导致外泌体破损
免疫亲和捕获法 ^[20]	使抗体与外泌体表面标志物结合,特异性捕获外泌体	抗体(如抗CD9、CD63、CD81体),磁珠或微珠(如DynaBeads),PBS或其他缓冲液	选择性高,纯度高,适合特定外泌体的捕获	成本较高,抗体的选择和纯化条件要求严格
超滤法 ^[21]	使用不同孔径的滤膜,按分子量或尺寸大小来分离外泌体	PBS	操作简便,提取效率较高	可能造成外泌体变形或被膜吸附,导致损失
试剂盒法 ^[21]	使用外泌体提取试剂盒,结合超滤或免疫捕获等技术提取外泌体	试剂盒:如ExoQuick、Total Exosome Isolation Reagent等	步骤简便,重复性较好,提取外泌体效率较高	成本高,可能不适用于大量样品或特定实验需求
PEG沉淀法 ^[22]	向样品中加入聚乙二醇,沉淀得到外泌体	聚乙二醇(PEG 8 000 Da或6 000 Da),氯化钠(NaCl,可选),PBS	操作简便,时间较短,适合大量样品处理	外泌体纯度较低,可能伴随较多的非特异性蛋白

相比于试剂盒法、免疫磁珠法，超速离心法耗时费力、外泌体回收率不高，但其提取纯度高、提取量大，且操作简单、成本较低。程福等^[23]利用电镜观察到 PEV 为直径约 30~150 nm 扁平或盘状的双层膜囊泡，通过免疫印迹技术检测出 PEV 特异性表达 CD9 分子，并证实了超速离心法可有效提取到外泌体。

在外泌体的提取过程中，提取纯度和提取量是关键问题。研究证明，血小板在存放过程中，会不断释放外泌体，随着存放时间的增加，血小板活化增加，释放的微粒也随之增加，所能提取到的外泌体也会增加^[24]。二甲基亚砜常常作为细胞冻存液的成分之一，既往研究表明，向冰冻血小板中加入 5%~6% 的二甲基亚砜后，其外泌体的提取产量有所提高，且形态相对有所改善^[25]。

3 载药

外泌体的生物学特性与其细胞来源密切相关，这一来源特性决定了其结构和功能的特异性。与其他来源的外泌体相比，血小板作为血液中的天然成分，具有优异的生物相容性，这使得 PEV 作为药物载体时能够最大程度地降低免疫排斥反应。值得注意的是，PEV 继承了血小板的生物学特性，能够通过与多种细胞的特异性相互作用，在炎症调控和组织修复过程中发挥重要作用。这

种独特的细胞靶向能力使 PEV 能够借助血管内皮细胞表面的特异性受体实现精准的药物递送。此外，血小板富含多种生物活性分子，包括生长因子、细胞因子等，这些功能性成分可随 PEV 一同递送至靶部位，与载带的治疗药物产生协同效应，从而显著提升治疗效果。

类似于脂质体药物递送系统，PEV 既可在磷脂双分子层中装载疏水性药物，如类固醇药物（地塞米松、氯噻吨）、化疗药物（紫杉醇、顺铂）和一些小分子抑制剂（TPCA-1、MCC950）等，也可以在囊泡中装载亲水性药物，如抗生素（青霉素、头孢菌素），抗病毒药物（阿昔洛韦、拉米夫定），以及一些天然药物（小檗碱）等。目前可通过多种物理化学方法将药物装载到外泌体中，常见的方法有共孵育法、电穿孔法、超声波法、冻融法等（表 2）。外泌体中最广泛应用的载药方法是以药物孵育外泌体源细胞，使得分泌的外泌体携带部分药物的共孵育法。该法方法简便、快速，但载药效率较低，且不适于亲水性药物分子。电穿孔法虽能将亲水性和疏水性的药物载入 PEV，但该法易导致外泌体积聚和破坏外泌体膜的完整性。机械挤出法与超声波法的载药效率高。冷冻法简便快捷，但效率较低，且对外泌体的粒径影响较大。可根据需求和实验条件对不同的药物分子进行载药。

表2 PEV的常用载药方法

Table 2. Common drug loading methods of PEV

方法名称	操作步骤	所用设备与试剂	优点	缺点
共孵育法 ^[26]	1. 将PEV与药物混合在PBS或缓冲液中 2. 在37℃孵育数小时至过夜 3. 通过超速离心或过滤去除未进入PEV的药物	PEV, PBS或其他缓冲液, 恒温孵育箱	操作简便, 不需复杂设备	药物载入效率较低, 药物进入外泌体的量难以控制
电穿孔法 ^[27-28]	1. 将PEV与药物混合在电穿孔缓冲液中 2. 使用电穿孔仪施加电压, 使PEV膜暂时性破裂 3. 电穿孔后, 通过超速离心去除未进入PEV的药物	PEV, 电穿孔缓冲液, 电穿孔仪	适合大分子药物, 载药效率高	电压过高可能损伤外泌体, 需精确控制电场参数
超声波法 ^[29]	1. 将PEV与药物混合在PBS中 2. 使用超声处理器对混合物施加超声波, 使PEV膜破裂并吸收药物 3. 通过超速离心去除未载入的药物	PEV, PBS, 超声处理器	适用于多种药物, 载药效率高	超声处理可能损伤外泌体, 需优化超声强度和时长
机械挤出法 ^[30]	1. 将PEV与药物混合在缓冲液中, 均匀搅拌 2. 将混合物装入挤出装置 3. 通过多个聚碳酸酯膜, 在机械压力下挤出混合物	挤出装置: 通常为脂质体挤出器 挤出时的过滤介质: 聚碳酸酯膜缓冲液: PBS-PEV	高效载药, 批量制备, 操作稳定	挤压可能损伤外泌体的膜结构, 影响其功能 载药效率较低, 尤其是极性较强或不稳定的药物

4 应用进展

PEV 携带的血小板 CD47 使其在体内的循环时间比人工纳米颗粒更长。同时,与大多数纳米颗粒类似,PEV 有更强的渗透性和滞留作用,可以被动地靶向肿瘤部位。PEV 最独特的能力是其主动靶向受损血管的能力。将药物装载入 PEV 中,并对其进行一定的工程学改造,利用其对特定细胞的亲和性、归巢效应等天然趋向性,可使其对特定的组织、受体细胞具有特异性,可改变其在体内的分布,从提高靶向递送效率,增强药物疗效,降低药物毒副作用。目前,研究人员利用 PEV 药物递送系统来递送治疗癌症、传染病和自身免疫性疾病在内的多种药物。

4.1 传染病领域的应用

核因子 κ B 激酶抑制剂具有强大的抗炎作用,但其全身不良反应大,阻碍了其在临床上的应用。Yao 等^[31]利用 PEV 装载核因子 κ B 激酶抑制剂 TPCA-1 来治疗由脂多糖引起的急性肺炎。该载体由室温下的血小板经凝血酶体外激活后,通过超速离心从血小板活化后的上清液中分离得到,后通过被动扩散和(或)疏水相互作用,将 TPCA-1 装入血小板中,然后活化血小板得到装载 TPCA-1 的载体。该药物的包封率为载药率约为 10.6%,载体粒径约为 100~150 nm,具有可控和持续的释放特性,48 h 可释放 85.3% 的载药。与游离的原型药物相比,在动物模型中,该药物-载体可显著降低细胞因子风暴综合征。

地塞米松虽可缓解感染新型冠状病毒后的肺部过度炎症,但只有少量药物能到达肺部炎症部位,而剩余其他大多非靶部位药物则可能带来严重的副作用。利用 PEV 靶向炎症部位的特性, Ma 等^[32]利用 PEV 装载地塞米松治疗肺炎。该载体由室温下的血小板活化过程中产生的细胞外囊泡经分离纯化后所得,其直径约为 140 nm。通过共孵育法,将地塞米松负载到 PEV 中。当孵育液的地塞米松浓度为 400 μ g/mL 时,载药量约为 6.54%, Zeta 电位为 -8.82 mV,体外可持续释药 50 h,释放度为 92.4%。与游离的地塞米松相比,在动物模型中,该药物载体不仅可以有效缓解肺部炎症,而且还可以显著减少地塞米松的用量。

Bateman 等^[33]设计了一种基于 PEV 的抗 HIV-1 药物递送系统。该载体由室温下的血小

板浓缩物振摇 3 d 后、离心分离所得,通过超声波法载入亲水性药物拉米夫定和疏水性药物替诺福韦两种抗病毒药物,两种药物的包封率分别为 68% 和 46%。载体平均粒径为 338 nm, Zeta 电位为 -8.98 mV,体外可持续释药约 50 h。与游离的原型药物相比,在体外实验中,该药物载体可成功抑制 HIV-1 复制且具有更低的细胞毒性。

4.2 自身炎症、免疫性疾病的应用

动脉粥样硬化是一种血管疾病,其特征是平滑肌细胞、巨噬细胞和淋巴细胞在动脉特定部位聚集。调控血管中失控的炎症反应不失为治疗动脉粥样硬化的一种策略。MCC950 是核苷酸结合结构域富含亮氨酸重复序列和含热蛋白结构域受体 3 炎症小体的小分子抑制剂,但在类风湿关节炎患者中发现该药具有一定的肝毒性。据此, Ma 等^[34]开发了一种装载 MCC950 的 PEV 给药系统来治疗动脉粥样硬化。该载体由血小板活化过程中产生细胞外囊泡分离纯化所得,载体粒径约为 100~150 nm。通过疏水相互作用将 MCC950 载入到血小板中,活化血小板后得到装载有 MCC950 的 PEV,载药率约为 7.1%,使用透析袋法测定体外释放情况,药物从 PEV 中释放可持续 48 h,累积释放度达 87%。与游离的 MCC950 相比,在动物实验中, MCC950-PEVs 对动脉粥样硬化斑块表现出有效的抗动脉粥样硬化作用。

Ma 等^[35]开发了一种基于 PEV 的类风湿关节炎靶向给药系统。该载体由血小板活化过程中产生细胞外囊泡分离纯化后得到。通过疏水相互作用将小檗碱载入到血小板中,活化血小板后得到装载小檗碱的 PEV,载药率约为 6.76%,载体粒径约为 140 nm, Zeta 电位为 -8.35 mV,体外可持续释放 50 h,而 48 h 内药物累积释放可达 91.9%。与游离的小檗碱相比,在动物实验中,该药物载体在治疗类风湿关节炎方面靶向性更强,病变部位药物浓度更高,具有更好的治疗效果。

Li 等^[30]设计了一种基于 PEV 的治疗缺血性心脏病药物递送系统。该载体系统由人 O 型血浆中的血小板颗粒反复冻融后得到 PEVs,然后与人类骨髓间充质干细胞来源的 EVs 混合,400 nm 和 200 nm 聚碳酸酯多孔膜各挤压 10 次,即得两种外泌体的融合体。所得融合的 PEV 的平均粒径 (139.9 ± 0.6) nm, Zeta 电位 -25.3 ± 1.6 mV,接

近血小板膜囊泡的 Zeta 电位。与人类骨髓间充质干细胞来源的 EVs 相比,融合后的 PEVs 优先在缺血心脏受损的内皮中聚集,并在缺血-再灌注小鼠模型中显示出显著的血管生成修复效力。

4.3 癌症领域的应用

PEV 不仅可以用于免疫性疾病的药物递送,也可以用于化疗药物的肿瘤靶向递送。纳米级的 PEV 可借助高渗透长滞留效应被动靶向于肿瘤部位^[36]。同时 PEV 表面的 P-选择素可与部分肿瘤细胞表面 P-选择素配体相结合,使 PEV 可主动靶向肿瘤细胞。载入紫杉醇后的 PEV 可以成功地在体外抑制包括乳腺癌细胞在内的多种肿瘤细胞,并降低药物对正常细胞的毒性。多柔比星 (doxorubicin, Dox) 是一种临床广泛使用的化疗药物,但 Dox 脂质体具有一定的消化系统不良反应。为了解决这一问题,研究人员利用装载 Dox 的 PEV 来增强药物对肿瘤细胞亲和力。Kailashiya 等^[37]研究证实,与游离 Dox 相比,PEV-Dox (Dox 浓度为 0.12 和 0.21 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 对癌细胞的毒性明显高于同等剂量的游离 Dox,在血管药物释放量更低的情况下,对人白血病细胞具有更低的半数效应浓度 (0.38 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 低于游离 Dox (0.58 $\mu\text{g}/\text{mL}$),对人白血病细胞的毒性更高。此外有研究表明,除了装载化疗药物治疗癌症以外,PEV 中的 miRNA 在血浆和其他体液中具有高度稳定性,能够反映肿瘤的状态和进展^[38-39]。

5 结语

PEV 来源天然、提取工艺简单,具有良好的生物相容性和安全性。作为药物载体,PEV 可用于装载水溶性和非水溶性药物,具有纳米尺寸的 PEV 在其膜表面的特异蛋白介导下,具有被动和主动靶向炎症部位的能力,是炎症靶向给药的理想载体。

尽管 PEV 在炎症、肿瘤等疾病的治疗方面表现出了巨大的潜力,但将其开发应用于临床仍面临着不少挑战。目前正在进行的与 PEV 相关的临床试验有卵巢再生、椎间盘病变、糖尿病足。制约 PEV 临床发展应用的主要堵点有以下 4 点。一是血小板来源外泌体具有高度多样性,其功能和特性取决于其来源,糖尿病患者来源的 PEV 在质量上与健康供体存在显著差异^[40],而老年个体来

源的 PEV 疗效也较差^[41],其次加工和储存条件也可能影响其性质。二是 PEV 产量较低,目前主要通过物理或化学方法(如凝血酶激活、氯化钙诱导、机械搅拌、冻融循环等)刺激血小板释放 PEV,这些方法产量较低,难以满足临床需求^[42]。三是目前 PEV 的分离方法均有一定缺陷,如超速离心是最常用的技术,但其耗时又有污染风险^[43]。过滤可以提高纯度,但产量较低;尺寸排阻色谱法可能会导致 PEV 表面冠层的损耗,影响其稳定性和功能^[44]。免疫捕获可以分离具有特定功能标记的 PEV,但扩大规模很困难。第四点是研究通常根据 PEV 大小和分布、形状和表面标记(CD9、CD63、CD81、膜联蛋白)评估 PEV,目前对外泌体特异性标志物仍缺乏共识,严重限制了不同研究结果的可比性和临床应用的可靠性。将来随着对 PEV 表面和结构的深入了解,利用生物工程、化学修饰等各种手段对 PEV 的内外成份和结构进行改造,应用先进的细胞培养方法和药物加工方式进行大规模生产,有望为药物递送系统的研究开辟一条崭新的道路。

参考文献

- 1 Billingsley MM, Haley RM, Wechsler ME, et al. Engineering precision nanoparticles for drug delivery[J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2021, 20(2): 101-124. DOI: [10.1038/s41573-020-0090-8](https://doi.org/10.1038/s41573-020-0090-8).
- 2 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](https://doi.org/10.1038/s41565-021-00931-2).
- 3 Biagiotti S, Abbas F, Montanari M, et al. Extracellular vesicles as new players in drug delivery: a focus on red blood cells-derived EVs[J]. *Pharmaceutics*, 2023, 15(2): 365. DOI: [10.3390/pharmaceutics15020365](https://doi.org/10.3390/pharmaceutics15020365).
- 4 Ying M, Zhuang J, Wei X, et al. Remote-loaded platelet vesicles for disease-targeted delivery of therapeutics[J]. *Adv Funct Mater*, 2018, 28(22): 1801032. DOI: [10.1002/adfm.201801032](https://doi.org/10.1002/adfm.201801032).
- 5 Yamanaka Y, Sawai Y, Nomura S. Platelet-derived microparticles are an important biomarker in patients with cancer-associated thrombosis[J]. *Int J Gen Med*, 2020, 12: 491-497. DOI: [10.2147/IJGM.S236166](https://doi.org/10.2147/IJGM.S236166).
- 6 Eustes AS, Dayal S. The role of platelet-derived extracellular vesicles in immune-mediated thrombosis[J]. *Int J Mol Sci*, 2022, 23(14): 7837. DOI: [10.3390/ijms23147837](https://doi.org/10.3390/ijms23147837).
- 7 Yun SH, Sim EH, Goh RY, et al. Platelet activation: the mechanisms and potential biomarkers[J]. *Biomed Res Int*, 2016, 2016: 9060143. DOI: [10.1155/2016/9060143](https://doi.org/10.1155/2016/9060143).
- 8 Boilard E, Bellio M. Platelet extracellular vesicles and the secretory interactome join forces in health and disease[J]. *Immunol*

- Rev, 2022, 312(1): 38–51. DOI: [10.1111/imr.13119](https://doi.org/10.1111/imr.13119).
- 9 Marcoux G, Laroche A, Hasse S, et al. Platelet EVs contain an active proteasome involved in protein processing for antigen presentation via MHC-I molecules[J]. *Blood*, 2021, 138(25): 2607–2620. DOI: [10.1182/blood.2020009957](https://doi.org/10.1182/blood.2020009957).
 - 10 Liu J, Kang R, Tang D. ESCRT-III-mediated membrane repair in cell death and tumor resistance[J]. *Cancer Gene Ther*, 2021, 28(1–2): 1–4. DOI: [10.1038/s41417-020-0200-0](https://doi.org/10.1038/s41417-020-0200-0).
 - 11 Meliciano A, Salvador D, Mendonça P, et al. Clinically expired platelet concentrates as a source of extracellular vesicles for targeted anti-cancer drug delivery[J]. *Pharmaceutics*, 2023, 15(3): 953. DOI: [10.3390/pharmaceutics15030953](https://doi.org/10.3390/pharmaceutics15030953).
 - 12 Wei H, Malcor JDM, Harper MT. Lipid rafts are essential for release of phosphatidylserine-exposing extracellular vesicles from platelets[J]. *Sci Rep*, 2018, 8(1): 9987. DOI: [10.1038/s41598-018-28363-4](https://doi.org/10.1038/s41598-018-28363-4).
 - 13 Bordin A, Chirivì M, Pagano F, et al. Human platelet lysate - derived extracellular vesicles enhance angiogenesis through MIR -126[J]. *Cell Proliferat*, 2022, 55(11): e13312. DOI: [10.1111/cpr.13312](https://doi.org/10.1111/cpr.13312).
 - 14 Lootens T, Roman BI, Stevens CV, et al. Glioblastoma-associated mesenchymal stem/stromal cells and cancer-associated fibroblasts: partners in crime?[J]. *Int J Mol Sci*, 2024, 25(4): 2285. DOI: [10.3390/ijms25042285](https://doi.org/10.3390/ijms25042285).
 - 15 Antich-Roselló M, Forteza-Genestra MA, Calvo J, et al. Platelet-derived extracellular vesicles promote osteoinduction of mesenchymal stromal cells[J]. *Bone Joint Res*, 2020, 9(10): 667–674. DOI: [10.1302/2046-3758.910.BJR-2020-0111.R2](https://doi.org/10.1302/2046-3758.910.BJR-2020-0111.R2).
 - 16 Vajen T, Benedikter BJ, Heinzmann ACA, et al. Platelet extracellular vesicles induce a pro-inflammatory smooth muscle cell phenotype[J]. *J Extracell Vesicles*, 2017, 6(1): 1322454. DOI: [10.1080/20013078.2017.1322454](https://doi.org/10.1080/20013078.2017.1322454).
 - 17 Miyazawa B, Trivedi A, Togarrati PP, et al. Regulation of endothelial cell permeability by platelet-derived extracellular vesicles[J]. *J Trauma Acute Care Surg*, 2019, 86(6): 931–942. DOI: [10.1097/TA.0000000000002230](https://doi.org/10.1097/TA.0000000000002230).
 - 18 Gaspar RS, Ferreira PM, Mitchell JL, et al. Platelet-derived extracellular vesicles express NADPH oxidase-1 (Nox-1), generate superoxide and modulate platelet function[J]. *Free Radical Biol Med*, 2021, 165: 395–400. DOI: [10.1016/j.freeradbiomed.2021.01.051](https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2021.01.051).
 - 19 Graça AL, Gómez-Florit M, Osório H, et al. Controlling the fate of regenerative cells with engineered platelet-derived extracellular vesicles[J]. *Nanoscale*, 2022, 14(17): 6543–6556. DOI: [10.1039/D1NR08108J](https://doi.org/10.1039/D1NR08108J).
 - 20 Pienimäki-Roemer A, Kuhlmann K, Böttcher A, et al. Lipidomic and proteomic characterization of platelet extracellular vesicle subfractions from senescent platelets[J]. *Transfusion*, 2015, 55(3): 507–521. DOI: [10.1111/trf.12874](https://doi.org/10.1111/trf.12874).
 - 21 Lobb RJ, Becker M, Wen S, et al. Optimized exosome isolation protocol for cell culture supernatant and human plasma[J]. *J Extracell Vesicles*, 2015, 4(1): 27031. DOI: [10.3402/jev.v4.27031](https://doi.org/10.3402/jev.v4.27031).
 - 22 Weng Y, Sui Z, Shan Y, et al. Effective isolation of exosomes with polyethylene glycol from cell culture supernatant for in-depth proteome profiling[J]. *The Analyst*, 2016, 141(15): 4640–4646. DOI: [10.1039/C6AN00892E](https://doi.org/10.1039/C6AN00892E).
 - 23 程福, 杨璐, 李小飞, 等. 单采血小板来源外泌体的提取与鉴定[J]. *标记免疫分析与临床*, 2019, 26(2): 343–346. [Cheng F, Yang L, Li XF, et al. Extraction and identification of exosomes from single-donor platelets[J]. *Labeled Immunoassays and Clinical Medicine*, 2019, 26(2): 343–346.] DOI: [10.11748/bjmy.issn.1006-1703.2019.02.039](https://doi.org/10.11748/bjmy.issn.1006-1703.2019.02.039).
 - 24 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(2): 353–362. [Li S, Hou X, Qi H, et al. Exosomes: providing natural endogenous nanocarriers for efficient drug delivery strategies[J]. *Progress in Chemistry*, 2016, 28(2): 353–362.] DOI: [10.7536/PC150915](https://doi.org/10.7536/PC150915).
 - 25 Waters L, Padula MP, Marks DC, et al. Cryopreserved platelets demonstrate reduced activation responses and impaired signaling after agonist stimulation[J]. *Transfusion*, 2017, 57(12): 2845–2857. DOI: [10.1111/trf.14310](https://doi.org/10.1111/trf.14310).
 - 26 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](https://doi.org/10.1038/mt.2010.105).
 - 27 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](https://doi.org/10.1016/j.omtm.2019.01.001).
 - 28 Faruqu FN, Xu L, Al-Jamal KT. Preparation of exosomes for siRNA delivery to cancer cells[J]. *J Vis Exp*, 2018, 142: 58814. DOI: [10.3791/58814](https://doi.org/10.3791/58814).
 - 29 陈晓峰, 王开元, 梁芳铭, 等. 外泌体递药系统及其在肿瘤治疗中的应用[J]. *化学进展*, 2022, 34(4): 773–786. [Chen XF, Wang KY, Liang FM, et al. Exosome drug delivery system and its application in tumor therapy[J]. *Progress in Chemistry*, 2022, 34(4): 773–786.] DOI: [10.7536/PC210901](https://doi.org/10.7536/PC210901).
 - 30 Li Q, Song Y, Wang Q, et al. Engineering extracellular vesicles with platelet membranes fusion enhanced targeted therapeutic angiogenesis in a mouse model of myocardial ischemia reperfusion[J]. *Theranostics*, 2021, 11(8): 3916–3931. DOI: [10.7150/thno.52496](https://doi.org/10.7150/thno.52496).
 - 31 Yao C, Wang C. Platelet-derived extracellular vesicles for drug delivery[J]. *Biomater Sci*, 2023, 11(17): 5758–5768. DOI: [10.1039/D3BM00893B](https://doi.org/10.1039/D3BM00893B).
 - 32 Ma Q, Yao C, Shi H, et al. Targeted delivery of dexamethasone in acute pneumonia[J]. *Biomater Sci*, 2021, 9(16): 5569–5576. DOI: [10.1039/D1BM00924A](https://doi.org/10.1039/D1BM00924A).
 - 33 Bateman RM, Sharpe MD, Jagger JE, et al. 36th International Symposium on Intensive Care and Emergency Medicine: Brussels, Belgium. 15–18 March 2016[J]. *Crit Care*, 2016, 20(Suppl 2): 94. DOI: [10.1186/s13054-016-1208-6](https://doi.org/10.1186/s13054-016-1208-6).
 - 34 Ma Q, Fan Q, Han X, et al. Platelet-derived extracellular vesicles to target plaque inflammation for effective anti-atherosclerotic

- therapy[J]. *J Control Release*, 2021, 329: 445–453. DOI: [10.1016/j.jconrel.2020.11.064](https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2020.11.064).
- 35 Ma Q, Bai J, Xu J, et al. Reshaping the inflammatory environment in rheumatoid arthritis joints by targeting delivery of berberine with platelet-derived extracellular vesicles[J]. *Adv Nanobio Res*, 2021, 1(11): 2100071. DOI: [10.1002/anbr.202100071](https://doi.org/10.1002/anbr.202100071).
- 36 Wei Z, Chen Z, Zhao Y, et al. Mononuclear phagocyte system blockade using extracellular vesicles modified with CD47 on membrane surface for myocardial infarction reperfusion injury treatment[J]. *Biomaterials*, 2021, 275: 121000. DOI: [10.1016/j.biomaterials.2021.121000](https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2021.121000).
- 37 Kailashiya J, Gupta V, Dash D. Engineered human platelet-derived microparticles as natural vectors for targeted drug delivery[J]. *Oncotarget*, 2019, 10(56): 5835–5858. DOI: [10.18632/oncotarget.27223](https://doi.org/10.18632/oncotarget.27223).
- 38 Torres-Bustamante MI, Vazquez-Urrutia JR, Solorzano-Ibarra F, et al. The role of miRNAs to detect progression, stratify, and predict relevant clinical outcomes in bladder cancer[J]. *Int J Mol Sci*, 2024, 25(4): 2178. DOI: [10.3390/ijms25042178](https://doi.org/10.3390/ijms25042178).
- 39 Murshed A, Alnoud MAH, Ahmad S, et al. Genetic alchemy unveiled: microRNA-mediated gene therapy as the artisan craft in the battlefield against hepatocellular carcinoma—a comprehensive chronicle of strategies and innovations[J]. *Front Genet*, 2024, 15: 1356972. DOI: [10.3389/fgene.2024.1356972](https://doi.org/10.3389/fgene.2024.1356972).
- 40 Guda PR, Sharma A, Anthony AJ, et al. Nanoscopic and functional characterization of keratinocyte-originating exosomes in the wound fluid of non-diabetic and diabetic chronic wound patients[J]. *Nano Today*, 2023, 52: 101954. DOI: [10.1016/j.nantod.2023.101954](https://doi.org/10.1016/j.nantod.2023.101954).
- 41 Chowdhary K, Sahu A, Iijima H, et al. Aging affects the efficacy of platelet-rich plasma treatment for osteoarthritis[J]. *Am J Phys Med Rehabil*, 2023, 102(7): 597–604. DOI: [10.1097/PHM.000000000000216](https://doi.org/10.1097/PHM.000000000000216).
- 42 Gupta AK, Wang T, Rapaport JA, et al. Therapeutic Potential of extracellular vesicles (exosomes) derived from platelet-rich plasma: a literature review[J]. *J Cosmet Dermatol*, 2025, 24(2): e16709. DOI: [10.1111/jocd.16709](https://doi.org/10.1111/jocd.16709).
- 43 Puricelli C, Boggio E, Gigliotti CL, et al. Platelets, protean cells with all-around functions and multifaceted pharmacological applications[J]. *Int J Mol Sci*, 2023, 24(5): 4565. DOI: [10.3390/ijms24054565](https://doi.org/10.3390/ijms24054565).
- 44 Gomes FG, Andrade AC, Wolf M, et al. Synergy of human platelet-derived extracellular vesicles with secretome proteins promotes regenerative functions[J]. *Biomedicines*, 2022, 10(2): 238. DOI: [10.3390/biomedicines10020238](https://doi.org/10.3390/biomedicines10020238).

收稿日期: 2024 年 12 月 10 日 修回日期: 2025 年 02 月 28 日
本文编辑: 李 阳 桂裕亮