

· 综述 ·

外排体作为新型给药系统的研究进展

王 舒¹, 张振海², 顾冬飞³, 周建平¹, 吕慧侠^{1*}⁽¹⁾中国药科大学药剂学教研室, 南京 211198; ⁽²⁾江苏省中医药研究院, 南京 210028; ⁽³⁾常州康普药业有限公司, 常州 213172)

摘 要 外排体是由多泡体或称为多囊体与细胞膜融合并分泌到胞外的一种膜性小囊泡, 具有多种免疫功能, 其表面含有大量的与其来源和功能密切相关的蛋白质和脂质成分, 具有去除细胞生长过程中的废弃蛋白、信号传导、提呈抗原激活 T 细胞以及诱发和增强机体免疫反应等功能。近年来, 有研究者利用外排体负载药物, 将其发展成为一种纳米给药体系, 以避免某些外源性纳米载体可能发生的不良反应以及免疫排斥反应。本文综述了对这种新型纳米载体的发现、功能以及作为给药载体的研究进展, 以丰富药剂学的载药系统, 并为纳米给药系统的研究提供新的思路。

关键词 外排体; 免疫; 细胞间通讯; 药物递送系统

中图分类号 R944 **文献标志码** A **文章编号** 1000-5048(2014)02-0247-06

doi:10.11665/j.issn.1000-5048.20140221

Advances of exosomes as a new drug delivery system

WANG Shu¹, ZHANG Zhenhai², GU Dongfei³, ZHOU Jianping¹, LÜ Huixia^{1*}¹School of Pharmacy, China Pharmaceutical University, Nanjing 211198; ²Jiangsu Provincial Academy of Chinese Medicine, Nanjing 210028; ³Changzhou Kangpu Pharmaceutical Co., Ltd., Changzhou 213172, China

Abstract Exosome is a kind of immune functional membrane vesicles secreted from multivesicular body fusing with cell membrane. It contains a large number of closely related functional protein and lipid components, with the functions of cell growth proteins waste removal, signal transduction, antigen presentation, cells activation, inducing and enhancing immune response. In recent years, some researchers used exosomes as nanocarriers to avoid the possible side-effects and immune rejection of usual exogenous nanocarriers. This review briefly describes its discovery, function and development as a drug carrier with reference to some recent research papers to replenish a novel drug delivery system.

Key words exosomes; immunity; cell communication; drug delivery system

This study was supported by the Fundamental Research Funds for the Central Universities (No. JPKQ2011016)

传统的药物输送系统(如脂质体等)具有很多优点,易于制备并可以根据靶向细胞的特点进行修饰,从而达到不同的设计目的。但是,它们在穿透细胞膜前即有可能被免疫系统所摄取,进入细胞后可能被代谢或排泄掉。有些载体由于其所用的材料可能还具有一定的细胞毒性和免疫源性,且它们的靶向性以及细胞穿透能力也并不尽如人意^[1]。与这些采用外源性物质制备而成的载体相比,采用外排体等内源性物质(病毒、血红蛋白、巨噬细胞、

淋巴细胞和一些干细胞都属于此类)作为药物载体,其具有可以逃避宿主免疫细胞吞噬、高度的选择性和体内循环时间长、寿命长等特点^[2-3]。

近年来 Jasper 等^[4]研究认为,细胞释放的外排体可以与现今常用的纳米载体(如脂质体、胶束)一样负载生物活性物质如蛋白质, mRNA 和 miRNA,运输其进入普通载体难以进入的细胞内或细胞器中的特定靶点,进行疾病的更为精确的干预和治疗^[5]。有研究表明,外排体未显示任何

的细胞毒性及肝脏累积毒性;同时可以满足纳米尺寸(30~100 nm)的要求,外排体具有了成为纳米载体的可能;并且不同宿主细胞释放的外排体具有不同的生物学效应和靶向特殊性,因此不同类型的外排体作为药物载体还可以实现个体化给药。此外,外排体还具有许多药物载体所必需的基本特性:如在体液中分布广泛,易于得到;可以作为DNA或RNA的载体间接在细胞间转运mRNA和miRNA;更重要的是也可以通过修饰,进一步增强其靶向性^[6-7]。

本文简要介绍外排体的来源、药理作用及作为药物载体在药剂学上的应用,为开发新的药物载体系统提供新的思路。

1 外排体的组成及功能

20世纪70年代末,Rose Johnstone发现绵羊网状细胞分泌的某些小囊泡与核内体(endosomes,也称内涵体)结构非常类似,不同之处在于核内体与细胞的内存作用紧密相关,而小囊泡可外排物质而非内存并导入物质的功能^[8-10]。这些小囊泡来自于凋亡细胞和活细胞的隐藏成分——细胞内存途径中的晚期核内体,即多泡状体(multivesicular body, MVB)或成为多囊体的膜向内出芽(budding),形成一个膜包围的结构,其分离、脱落形成的MVB内小囊泡;这些包含小囊泡的MVB一部分可能与溶酶体(lysosome)融合,内部物质进入溶酶体被降解;而另一部分MVB可能与质膜融合,导致其内部所含的膜性小囊泡分泌到胞外,这些被分泌到胞外的小囊泡即为外排体^[11]。与一般囊泡不同的是,外排体不具有质膜而囊泡有质膜^[12-13]。外排体具有脂质双分子层结构,直径约为30~100 nm,电镜下呈现特征性的杯状结构,内部为低电子密度物质。外排体的组成成分相当复杂,主要由蛋白质和脂质组成,不同来源的外排体的脂质比例和含量有所不同,其所携带的蛋白质也具有特异性^[4]。许多细胞都释放外排体,如树突状细胞(dendritic cells)、B淋巴细胞、T淋巴细胞等,同时外排体在大多数体液中都存在,包括脑脊髓液中^[14-15]。目前研究较多的是树突细胞和人类间质干细胞产生的外排体及肿瘤细胞来源的外排体。

长久以来,外排体一直被认为是血管废物或细胞平衡的附带产物,直到B细胞被证实能够释放

功能性转移抗原外排体,这一观点才被打破。目前一般认为外排体有两大作用:一是消除细胞成熟过程中已经退化的蛋白质(即废弃蛋白);二是外排体含有多种特异性蛋白,这种特异性蛋白可以作为不同细胞表面受体的配体,结合到靶细胞的表面,从而在不同细胞间传递信号,发挥介导细胞间信息的功能。不同来源的外排体携带不同的特异性蛋白,发挥不同的生物学作用,如来源于树突状细胞的外排体可以诱导细胞毒性T细胞介导的反应,从而导致已形成的肿瘤消退^[16],不同来源的外排体组成成分及功能简述如下。

1.1 树突细胞(dendritic cell, DC)来源的外排体(DEX)

树突细胞(DC细胞)分为髓系(DC1)和淋巴系(DC2)两类,它既有吞噬功能,又有提呈抗原的作用。两类DC均起源于体内的多功能造血干细胞,但它们各自的前体细胞不同。DC1的前体是外周血中的单核细胞,与单核细胞及粒细胞有共同祖先;而DC2的前体是浆细胞样T细胞,与T细胞、NK细胞有共同祖先。DC是目前已知功能最强的抗原呈递细胞(antigen presenting cell, APC),含有丰富的MHC I(主要组织相容性复合体I, major histocompatibility complex, MHC I)、MHC II、CD86(属于免疫球蛋白超家族,在B细胞及单核细胞中表达,主要表达在成熟DC细胞,是CD28的配体)等重要的免疫分子。DC在外周组织中处于非成熟状态,但具有极强的抗原内存和加工处理能力,即抗原提呈能力。在它摄取抗原或受到某些因素刺激后,可以分化成熟,同时发生迁移,由外周组织通过淋巴管和血液循环进入次级淋巴器官,然后激发T细胞应答。DC细胞是已知体内功能最强、唯一能活化静息T细胞的专职抗原提呈细胞,也是启动、调控和维持免疫应答的中心环节,在免疫反应中起着重要的作用,常做为肿瘤生物治疗的疫苗^[16-17]。DC细胞膜表面的MHC分子与抗原结合后发生内存,形成的晚期核内体,与质膜融合后将外排体释放到胞外^[10]。这些DC来源的外排体有可能充当抗原提呈细胞-T细胞间、抗原提呈细胞间传递功能性MHC/抗原肽复合物的载体,从而启动T细胞免疫效应。DEX诱导抗肿瘤的作用机制目前尚不清楚,由于DEX富含MHC/抗原肽复合物、细胞间黏附分子-1(ICAM-1)和共刺激分子

B7,因此可能存在直接的抗原呈递作用^[13,16,18]。

由于DC的上述功能,通过采用病人自体的单核细胞在体外培养诱导生成负载肿瘤抗原DC,当细胞数量达到一定数量后再回输给病人,这些树突状细胞注入体内后刺激体内的肿瘤杀伤性淋巴细胞增殖,发挥长期肿瘤监视和杀伤作用,达到消灭肿瘤的目的。目前研究表明此法可用于恶性黑色素瘤、前列腺癌、肾癌、膀胱癌、卵巢癌、结肠癌、直肠癌等各种癌症的治疗。杜英等^[19]实验证实,来源于脑胶质瘤患者外周血的DC及其衍生的DEX具有促进T细胞增殖和诱导CTL对肿瘤细胞的特异性杀伤作用,能在体外促进T细胞增殖、并诱导出强烈的特异性抗肿瘤活性,尤其是凋亡细胞和RNA致敏的DC作用更强。因外排体可以进行冷冻保存,因此该实验组在培养DC的同时,通过收集培养上清液获得DEX,由于采用DC进行的生物治疗方法是多疗程的,冷冻保存所获得的DEX可以代替DC做再次的生物治疗,从而避免了反复采血以培养DC的过程。

1.2 间充质干细胞(mesenchymal stem cell, MSC)来源的外排体

它具有分化成多种组织细胞的能力,但却失去了发育成整个个体的能力,因此被称之为多功能干细胞。MSC分布广泛,人们已经从多种组织(如骨髓、肌肉、脂肪、脐带、胎盘骨骼)等中分离出MSC。临床上将MSC应用于解决多种血液系统疾病,如治疗心血管疾病、肝硬化、自身免疫性疾病以及膝关节半月板部分切除损伤修复等,同时MSC还在神经系统修复方面具有广阔的发展空间^[20],此外,MSC特有的低免疫源性和免疫抑制的作用,使其在治疗各种退行性和衰竭性疑难病症方面颇具潜力。

MSC的免疫调节作用很多时候是通过外排体来实现的,通过MSC获取外排体,避免了伦理问题和需要大量活体繁殖的难题^[7]。MSC产生的外排体具有动物模型的治疗效果和免疫抑制活性,其外排体的数量和质量不会因为无限增殖而缺乏免疫力,分化的MSC细胞群产生的外排体不论是产物还是治疗效果均无影响。在大部分干细胞(如胚胎干细胞、造血干细胞、神经干细胞等)中,间充质干细胞(MSC)是最容易获得的原代细胞,很多组织均可得到,包括脂肪组织、肝、肌肉、羊水、胎盘、脐带血、骨髓等。实验证实,人源MSC的外排体注

入无免疫小鼠体内,对心肌缺血再灌注具有治疗作用,同时并没有明显的副作用^[21]。此外,当MSC高度增殖时,其安全性并没有改变。因此,目前MSC是唯一已知的具有大规模产生外排体能力的理想候选细胞^[21]。

1.3 肿瘤来源的外排体(tumor-derived exosomes, TEX)

肿瘤来源外排体(TEX)具有将肿瘤抗原转移至抗原呈递细胞的能力,因此,细胞靶向性相关蛋白(CD9、乳黏素、CD11b)的浓集和热休克蛋白的蓄积都与TEX有关。Joseph等^[22]研究发现,人源TEX含有肿瘤排斥抗原,能转移至树突细胞,交叉呈递抗原到MHC I分子上,使细胞毒性T淋巴细胞活化^[18],介导T淋巴细胞依赖的抗肿瘤免疫,且抗肿瘤作用不受组织和MHC的限制^[22]。

尽管TEX在体内具有一定的抗肿瘤作用,但是在单独应用时效果有限,为进一步增强抗肿瘤作用,Chen等^[23]使用热休克肿瘤细胞制备TEX,经修饰后的TEX可以聚集更多的免疫原性细胞并可增强抗肿瘤活性。Yang等^[24,44]使用白介素-2基因修饰肿瘤细胞,制备的TEX中含有白介素-2,增强了TEX的抗肿瘤活性。有研究表明,只有转移到成熟DC中,TEX才能在体内有效地促进初级MHC I类限制性效应——CD8 + T细胞的反应,因此Chaput等^[25]通过在外排体中增加佐剂CpG(胞嘧啶鸟嘌呤二核苷酸)来触发高效MHC限制性CD8 + T细胞反应,增强TEX的抗肿瘤作用。

在临床实验中,可行性较高的外排体还有血红蛋白、巨噬细胞等,其中巨噬细胞来源^[45]外排体被证实与病原体感染有关。

1.4 不同来源外排体的细胞间传递信号功能

外排体可以通过肿瘤与树突细胞之间的特异性抗体反馈抑制肿瘤,并通过趋化依赖方式吸引免疫细胞到达肿瘤部位,因此,利用外排体的免疫调节作用及抗肿瘤作用^[4,22,26-28]进行各种疾病的治疗。修饰后的外排体可靶向干扰癌细胞间的细胞传递信号,直接有效地诱导癌细胞凋亡而不影响正常细胞,是一种可行性很高的肿瘤靶向治疗手段。

1.4.1 外排体可以选择性嵌入不同的miRNA,调节不同受体细胞的基因表达^[33] Meckes等^[29]在疱疹病毒V型阳性鼻咽癌细胞中获得了含有LMP1(EB病毒编码基因)和EB编码miRNA的外

排体,进而证实了 EB 编码的 miRNA 可通过外排体向细胞传递信号,并可激活细胞外信号调节激酶和磷脂酰肌醇 3 激酶信号通路。在大鼠脂肪细胞中发现的外排体能够水平迁移,调节相关 miRNA 及糖基磷脂酰肌醇类锚定蛋白的基因编码,影响脂肪的生成和分解^[31]。此外,Akao 等^[32]将人单核细胞性白血病细胞进行分化和改性脂转染,制备出含有苯-吡啶类似物修饰 3' 位化学改性 miRNA 的外排体,其可抑制肿瘤细胞使用 siRNA,达到抗肿瘤的目的。

外排体具有进行基因治疗和 RNA 干扰的潜能,可获得宿主组织器官的转录序列,也可通过分析 esRNA 模板进行微创临床诊断。Yang 等^[36]发现巨噬细胞通过外排体对乳腺癌致癌 miRNA 进行调节,干扰了癌症细胞间信号传递进而阻止了癌症的转移和发展。

1.4.2 外排体穿梭机制的提出 Eldh 等^[30]发现在氧化应激反应中,外排体的作用与细胞表面功能性 RNA 穿梭相关,从而导致在不同外界环境下,体外产生不同的 mRNA。此外,从 MC/9 小鼠肥大细胞系、HMC-1 人肥大细胞系^[34]、小鼠初级骨髓衍生肥大细胞和人肝癌细胞^[35]中获得的外排体均可以证实,RNA 可通过外排体在细胞间传递,因此有学者提出了一种新的机制——外排体穿梭 RNA (esRNA)。外排体穿梭机制的提出进一步阐明了外排体在细胞信号通路中的作用,外排体可以调节细胞功能及 miRNA 的使用,同时,对所包含的 miRNA 种类具有选择性,进而调节基因表达。

2 外排体作为药物载体的应用

2.1 基因治疗载体

由于外排体本身具有间接在细胞间转运 mRNA 和 miRNA,参与 mRNA 在受体细胞翻译等免疫调节的功能,将外排体直接作为药物进行疾病治疗,人们已经做了大量的研究,然而,将外排体作为一种天然来源的药物载体,也正在显示出诱人的前景。

Alvarez-Erviti 等^[18]首次使用外排体负载大分子物质,采用修饰 DC 表达狂犬病毒糖蛋白(RVG),并将其融合到 Lamp2b 蛋白中,当融合基因在 DC 中过度表达时,该 DC 分泌的外排体表面膜表达出了 RVG 肽。RVG 具有很强的脑靶向性,所得到的外排体能靶向于脑内神经元、少突触胶质细胞和寡突细

胞。实验者将修饰过的未成熟 DC 所分泌的外排体通过电击致孔方式载入一段抑制 BACE1 (BACE1 与阿尔茨海默病中大脑 β -淀粉样蛋白斑空洞的形成有关)的基因 siRNA,并注射入小鼠体内,研究结果表明,修饰后的载药外排体可以克服血-脑脊液屏障,在脑中停留并将所装载的 siRNA 运送至脑神经元、神经突触、胶质神经元及这些神经元细胞的前体细胞。实验结果还表明,这种外排体所携带的 siRNA 对 BACE1 相关基因和蛋白分别达到 62% 和 60% 的敲除率,从而证实了外排体作为全身性靶向 siRNA 运输工具的可行性^[18,27,37]。

最近的研究发现,miRNA 除了可以调节机体的细胞增殖、分化过程,它的表达还与多种肿瘤相关,某些 miRNA 在基因组上定位于与肿瘤相关的脆性位点 (fragile site),这说明 miRNA 在肿瘤发生过程中起至关重要的作用,这些 miRNA 所起的作用类似于抑癌基因和癌基因的功能。而由于 miRNA 寿命具有不确切性,通过修饰肿瘤细胞产生并包含所特定抑癌 miRNA 的外排体,也可以成为利用外排体基因治疗的新思路^[38]。

与病毒、脂质体纳米粒和聚阳离子纳米载体相比,外排体作为 siRNA、miRNA 等基因的运输载体也具有明显的优势。首先作为一种天然来源的载体,它不会在肝、组织等体内不同部位沉积并产生免疫排斥反应,同时由于外排体可以直接进入细胞液,避免了常规载体在细胞外环境中所受的攻击和代谢消除,延长了体内循环时间,因此将外排体作为基因载体进行干扰治疗具有广阔的开发前景^[39]。

2.2 药物载体

将药物载入外排体以增强其口服吸收和体内靶向性,是外排体作为药物载体的另一个尝试。

姜黄素具有抗感染、抗自身免疫及抗肿瘤活性,可以用于在不同的类型细胞中调节众多靶点,但是,姜黄素生物利用度很低,释放不稳定,在肠中吸收效果不理想。Sun 等^[40]将 EL-4 衍生的外排体与姜黄素在 22 °C 混合,蔗糖梯度离心,取蔗糖浓度 45% 和 60% 的黄色条带清洗纯化。结果表明包含有姜黄素的外排体的粒径与原未处理的外排体相似,且表达同样的外排体表面标记蛋白,且 1 g 外排体可以结合 2.9 g 姜黄素。实验者还利用其他细胞系如 MDAMB231 (人腺癌细胞)、4T-1 (鼠乳腺肿瘤细胞系) 和原代小鼠胚胎成纤维细胞产生

的外排体进行载药实验,结果表明均可以达到以上类似的效果。Samir 等^[39]将含姜黄素的外排体经口或者腹膜注射,结果表明其可以增加姜黄素的抗感染活性,还可以用于抢救小鼠由于注射内毒素引起的感染性休克。同时外排体可以运输姜黄素或 STAT3(信号转录传导子与激活子3)抗体 JSI124(cucurbitacin-I, 葫芦素, 特异性阻断 STAT3 信号通路),在脑中产生抗神经炎和抑制非抑制性鼻腔植入肿瘤的生长。而姜黄素或 JSI124 进入大脑后,可以达到如下结果:一是保护脂多糖诱导的脑炎;二是减缓髓磷脂少突触胶质细胞糖蛋白肽诱导的自身免疫脑脊髓炎实验模型的疾病进程;三是延缓 GL26 脑瘤模型的肿瘤生长。

外排体还可以有效地通过鼻腔,以非侵入方式(可能以小胶质细胞摄取的方式)透过血-脑脊液屏障,自发地于脑内浓集。同样是 Sun 等^[40]实验证明,外排体的鼻内给药具有高效地吸收和在脑中的抗 stat3 抑制剂的作用。Illum^[41]提出两种可能通过鼻腔进入血-脑脊液屏障的途径:通过呼吸系统丰富的脉管系统进入体循环,最后通过血-脑脊液屏障到达大脑;嗅觉区在鼻腔顶端,纳米粒子可以直接通过鼻腔以旁路途径进入脑组织。但这种被动吸收需要通过紧密的细胞连接或神经元追踪,吸收很慢,需要实验进一步证实^[42-43]。与常规纳米粒相比,外排体的自体来源性以及有效的药物传递作用,为脑细胞免疫耐受方面的研究提供了新的思路。

3 结 语

外排体作为一种天然来源的物质,由于其特殊的结构和生物学功能,可以成为一种新型的药物载体。由于细胞自身携带的信息分子数量大而且功能复杂,来源于不同种类细胞的外排体结构功能亦复杂多变而且各具特征。作为使用外排体作为药物载药系统药剂学领域刚刚起步。但是,基于来源于不同细胞的外排体含有源细胞最关键的功能分子,因而具有了其他载体不可比拟的优点,有望成为临床免疫性疾病尤其是肿瘤治疗的新型靶向载体。同时,针对不同组织类型的肿瘤和病变细胞,如何选择最具靶向性的细胞源性外排体、其确切的作用机制以及靶向的途径尚需进行大量的进一步的研究工作。

参 考 文 献

- [1] Torchilin VP. Recent advances with liposomes as pharmaceutical carriers[J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2005, **4**(2): 145 - 160.
- [2] Simons M, Raposo G. Exosomes-vesicular carriers for intercellular communication[J]. *Cell Biol*, 2009, **21**(4): 575 - 581.
- [3] van den Boorn JG, Schlee M, Coch C, et al. SiRNA delivery with exosome nanoparticles[J]. *Nat Biotechnol*, 2011, **29**(4): 325 - 326.
- [4] van den Boorn JG, Dassler J, Coch C, et al. Exosomes as nucleic acid nanocarriers[J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2013, **65**(3): 331 - 335.
- [5] Valenti R, Huber V, Iero M, et al. Tumor-released microvesicles as vehicles of immunosuppression[J]. *Cancer Res*, 2007, **67**(7): 2 912 - 2 915.
- [6] Valadi H, Ekstrom K, Bossios A, et al. Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells[J]. *Nat Cell Biol*, 2007, **9**(6): 654 - 659.
- [7] Ronne WYY, Ruenn CL, Zhang B, et al. Mesenchymal stem cell: an efficient mass producer of exosomes for drug delivery[J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2013, **65**(3): 336 - 341.
- [8] Couzin J. Cell biology: the ins and outs of exosomes[J]. *Science*, 2005, **308**(5 730): 1 862 - 1 863.
- [9] Orr L, Adam M, Rose J. Externalization of membrane-bound activities during sheep reticulocyte maturation is temperature and ATP dependent[J]. *Biochem Cell Biol*, 1987, **65**(12): 1 080 - 1 090.
- [10] Mitchell P, Petfalski E, Shevchenko A, et al. The exosome: a conserved eukaryotic RNA processing complex containing multiple 3'→5' exoribonucleases[J]. *Cell*, 1997, **91**(4): 457 - 466.
- [11] Li XB, Zhang ZR, Schluesener HJ, et al. Role of exosomes in immune regulation[J]. *Cell Mol Med*, 2006, **10**(2): 364 - 375.
- [12] Camussi G, Deregibus MC, Bruno S, et al. Exosome/microvesicle-mediated epigenetic reprogramming of cells[J]. *Am J Cancer Res*, 2011, **1**(1): 98 - 110.
- [13] Aaron T, Jayakumar R, Alexander M. Seifalian exosomes as nanotheranostic delivery platforms for gene therapy[J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2013, **65**(3): 357 - 367.
- [14] Heijnen HF, Schiel AE, Fijnheer R, et al. Activated platelets release two types of membrane vesicles: microvesicles by surface shedding and exosomes derived from exocytosis of multivesicular bodies and alpha-granules[J]. *Blood*, 1999, **94**(11): 3 791 - 3 799.
- [15] Street JM, Barran PE, MacKay CL, et al. Identification and proteomic profiling of exosomes in human cerebrospinal fluid[J]. *Transl Med*, 2012, **10**: 5. doi:10.1186/1479-5876-10-5.
- [16] Clayton A, Mason MD. Exosomes in tumour immunity[J]. *Curr Oncol*, 2009, **16**(3): 46 - 49.

- [17] Van den Broeke LT, Daschbach E, Thomas EK, *et al.* Dendritic cell—induced activation of adaptive and innate antitumor immunity[J]. *Immunol*, 2003, **171**(11): 5 842 – 5 852.
- [18] 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.
- [19] Du Y, Chen SQ, Huang YM, *et al.* Exosomes and dendritic cells derived from PBMCs of intracranial malignant glioma patients induce T-cell proliferation and CTL cytotoxicity[J]. *Immunol J* (免疫学杂志), 2006, **22**(6): 664 – 667.
- [20] Lai RC, Arslan F, Tan SS, *et al.* Derivation and characterization of human fetal MSCs: an alternative cell source for large-scale production of cardioprotective microparticles[J]. *Mol Cell Cardiol*, 2010, **48**(6): 1 215 – 1 224.
- [21] Chen TS, Arslan F, Yin Y, *et al.* Enabling a robust scalable manufacturing process for therapeutic exosomes through oncogenic immortalization of human ESC-derived MSCs[J]. *Transl Med*, 2011, **9**: 47. doi:10.1186/1479-5876-9-47.
- [22] Wolfers J, Lozier A, Raposo G, *et al.* Tumor-derived exosomes are a source of shared tumor rejection antigens for CTL cross-priming[J]. *Nat Med*, 2001, **7**(3): 297 – 303.
- [23] Chen W, Wang J, Shao C, *et al.* Efficient induction of antitumor T cell immunity by exosomes derived from heatshocked lymphoma cells[J]. *Eur J Immunol*, 2006, **36**(6): 1 598 – 1 607.
- [24] Yang Y, Xiu F, Cai Z, *et al.* Increased induction of antitumor response by exosomes derived from interleukin-2 gene-modified tumor cells[J]. *Cancer Res Clin Oncol*, 2007, **133**(6): 389 – 399.
- [25] Chaput N, Scharz NE, André F, *et al.* Exosomes as potent cell-free peptide-based vaccine. II. Exosomes in CpG adjuvants efficiently prime naive Tc1 lymphocytes leading to tumor rejection[J]. *Immunol*, 2004, **172**(4): 2 137 – 2 146.
- [26] Dai S, Wei D, Wu Z, *et al.* Phase I clinical trial of autologous ascites-derived exosomes combined with GM-CSF for colorectal cancer[J]. *Mol Ther*, 2008, **16**(4): 782 – 790.
- [27] Bhatnagar S, Shinagawa K, Castellino FJ, *et al.* Exosomes released from macrophages infected with intracellular pathogens stimulate a proinflammatory response *in vitro* and *in vivo*[J]. *Blood*, 2007, **110**(9): 3 234 – 3 244.
- [28] Alvarez-Erviti L, Seow YQ, Yin HF, *et al.* Delivery of siRNA to the mouse brain by systemic injection of targeted exosomes[J]. *Nat Biotechnol*, 2011, **29**(4): 341 – 345.
- [29] Meckes Jr. DG, Shair KH, Marquitz AR, *et al.* Human tumor virus utilizes exosomes for intercellular communication[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2010, **107**(47): 20 370 – 20 375.
- [30] Eldh M, Ekstrom K, Valadi H, *et al.* Exosomes communicate protective messages during oxidative stress; possible role of exosomal shuttle RNA[J]. *PLoS ONE*, 2010, **5**(12): e15353.
- [31] Muller G, Schneider M, Biemer-Daub G, *et al.* Microvesicles released from rat adipocytes and harboring glycosylphosphatidylinositol-anchored proteins transfer RNA stimulating lipid synthesis[J]. *Cell Signal*, 2011, **23**(7): 1 207 – 1 223.
- [32] Akao Y, Iio A, Itoh T, *et al.* Microvesicle-mediated RNA molecule delivery system using monocytes/macrophages[J]. *Mol Ther*, 2011, **19**(2): 395 – 399.
- [33] Mittelbrunn M, Gutierrez-Vazquez C, Villarroya-Beltri C, *et al.* Unidirectional transfer of microRNA loaded exosomes from T cells to antigen-presenting cells[J]. *Nat Commun*, 2011, **2**: 282.
- [34] Valadi H, Ekstrom K, Bossios A, *et al.* Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells[J]. *Nat Cell Biol*, 2007, **9**(6): 654 – 659.
- [35] Kogure T, Lin WL, Yan IK, *et al.* Intercellular nanovesicle-mediated microRNA transfer; a mechanism of environmental modulation of hepatocellular cancer cell growth[J]. *Hepatology*, 2011, **54**(4): 1 237 – 1 248.
- [36] Yang M, Chen J, Su F, *et al.* Microvesicles secreted by macrophages shuttle invasion-potentiating microRNAs into breast cancer cells[J]. *Mol Cancer*, 2011, **10**: 117. doi:10.1186/1476-4598-10-117.
- [37] Walker JD, Maier CL, Pober JS. Cytomegalovirus-infected human endothelial cells can stimulate allogeneic CD4 + memory T cells by releasing antigenic exosomes[J]. *Immunol*, 2009, **182**(3): 1 548 – 1 559.
- [38] 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): 1 769 – 1 779.
- [39] Samir EL A, Samira L, Imre M, *et al.* Exosomes for targeted siRNA delivery across biological barriers[J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2013, **65**(3): 391 – 397.
- [40] Sun DM, Zhuang XY, Xiang XY, *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): 1 606 – 1 614.
- [41] Illum L. Transport of drugs from the nasal cavity to the central nervous system[J]. *Eur J Pharm Sci*, 2000, **11**(1): 1 – 18.
- [42] Sun DM, Zhuang XY, Xiang XY, *et al.* Exosomes are endogenous nanoparticles that can deliver biological information between cells[J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2013, **65**(3): 342 – 347.
- [43] Vyas TK, Shahiwala A, Marathe S, *et al.* Intranasal drug delivery for brain targeting[J]. *Curr Drug Deliv*, 2005, **2**(2): 165 – 175.
- [44] Zhang Y, Luo CL, He BC, *et al.* Exosomes derived from IL-12-anchored renal cancer cells increase induction of specific antitumor response *in vitro*; a novel vaccine for renal cell carcinoma[J]. *Int J Oncol*, 2010, **36**(1): 133 – 140.
- [45] Bhatnagar S, Schorey JS. Exosomes released from infected macrophages contain *Mycobacterium avium* glycopeptidolipids and are proinflammatory[J]. *J Biol Chem*, 2007, **282**(35): 25 779 – 25 789.