

## 干细胞外泌体临床转化挑战与应对策略

丁琳<sup>1,2,3,4</sup> 梁敏莉<sup>1,2,3,4</sup> 钟嘉琪<sup>1,2,3,4</sup> 李富荣<sup>1,2,3,4</sup>

**【摘要】** 干细胞外泌体作为无细胞治疗方案,规避活细胞移植风险,具有更高生物安全性,且可通过工程化修饰增强组织靶向性和治疗效能,有望成为替代干细胞的新型治疗策略。针对如何提高干细胞外泌体产量、批次稳定性、治疗效能及活性维持等临床转化挑战,本综述提出3D培养联合永生生化细胞系方案、开发工程化赋能外泌体系统及发展创新外泌体保存技术的应对策略。旨在进一步推动干细胞外泌体在标准化生产、治疗应用及长效储存的临床转化进程。

**【关键词】** 干细胞; 外泌体; 临床转化; 工程化; 保存

### Challenges and coping strategies for the clinical translation of stem cell-derived exosomes

Ding Lin<sup>1,2,3,4</sup>, Liang Minli<sup>1,2,3,4</sup>, Zhong Jiaqi<sup>1,2,3,4</sup>, Li Furong<sup>1,2,3,4</sup>. <sup>1</sup>Center for Translational Medicine Collaborative Innovation, the First Affiliated Hospital (Shenzhen People's Hospital), Southern University of Science and Technology, Shenzhen 518020, China; <sup>2</sup>Shenzhen Immune Cell Therapy Public Service Platform, Shenzhen 518020, China; <sup>3</sup>Guangdong Engineering Technology Research Center of Stem Cell and Cell Therapy, Shenzhen 518020, China; <sup>4</sup>Shenzhen Key Laboratory of Stem Cell Research and Clinical Transformation, Shenzhen 518020, China

Corresponding author: Li Furong, Email: lifurong@mail.sustech.edu.cn

**【Abstract】** Stem cell-derived exosomes, as a cell-free therapeutic approach, circumvent the risks associated with live cell transplantation and offer enhanced biological safety. Through engineering modifications, they can augment tissue targeting and therapeutic efficacy, making them a promising new treatment strategy that could potentially replace stem cells. In response to the clinical translation challenges, such as improving the yield, batch stability, therapeutic efficacy, and activity maintenance of stem cell-derived exosomes, this review proposes coping strategies including the use of 3D culture combined with immortalized cell lines, the development of engineered exosome empowerment systems, and innovative exosome preservation techniques aiming to further advance the clinical translation process of stem cell-derived exosomes in standardized production, therapeutic applications, and long-term storage.

**【Key words】** Stem cells; Exosomes; Clinical translation; Engineering; Preservation

干细胞凭借其自我更新能力和多向分化潜能,在再生医学领域具有广阔的应用前景<sup>[1-7]</sup>。然而,一些临床试验未能显示出任何益处,这可能是由于干细胞临床治疗不可避免的局限性,如传代过程中功能衰退、异质性扩大、批次间疗效波动、存在免疫排斥和致瘤性风险,并且有限的扩增能力制约规模化生产产能,生物学效能受微环境影响大,治疗效果难标准化等<sup>[8-10]</sup>。而干细胞来源外泌体作为无细胞治疗策略,为突破以上瓶颈提供新路径。干细胞外泌体是由干细胞分

泌的30~150 nm纳米级囊泡,携带生物活性物质,介导细胞通讯<sup>[11]</sup>。与干细胞相比,外泌体因具有更低的免疫原性及致瘤风险而安全性更高;具有工程化改造潜力,可增强靶向性和治疗效能;且其便于储存和运输,临床适用性更强<sup>[12-13]</sup>。

尽管外泌体疗法在诸多领域实现突破,但其临床转化仍面临3大核心挑战。一是规模化生产与标准化难题,不同来源干细胞和不同制备批次的外泌体异质性显著,影响治疗效果;二是治疗效能亟待优化,需进一步提升外泌体的靶向性、递送效率和功能活性;三是储存时活性维持困难,冷冻、冻干过程造成外泌体活性成分损失,因此需要开发新型保护剂保障外泌体活性成分长期稳定。为应对这些挑战,本综述提出多维度解决方案:一是借助建立永生生化干细胞系或应用微载体联合生物反应器,实现外泌体的稳定扩增;二是运用基因修饰、化学修饰等工程化手段增强外泌体功能;三是开发低温保存新技术,减少冻存过程中对外泌体膜的破坏和活性成分的损失(图1)。

DOI: 10.3877/cma.j.issn.2095-1221.2025.05.007

基金项目: 国家自然科学基金(32300784); 深圳市医学研究专项(A2403018); 深圳市科技计划资助(JCYJ20220818102605012); 国家重点研发计划(2022YFA1104900)

作者单位: 518020 深圳,南方科技大学第一附属医院(深圳市人民医院)转化医学协同创新中心<sup>1</sup>; 518020 深圳市免疫细胞治疗公共服务平台<sup>2</sup>; 518020 深圳,广东省干细胞与细胞治疗工程技术研究中心<sup>3</sup>; 518020 深圳市干细胞研究与临床转化重点实验室<sup>4</sup>

通信作者: 李富荣, Email: lifurong@mail.sustech.edu.cn

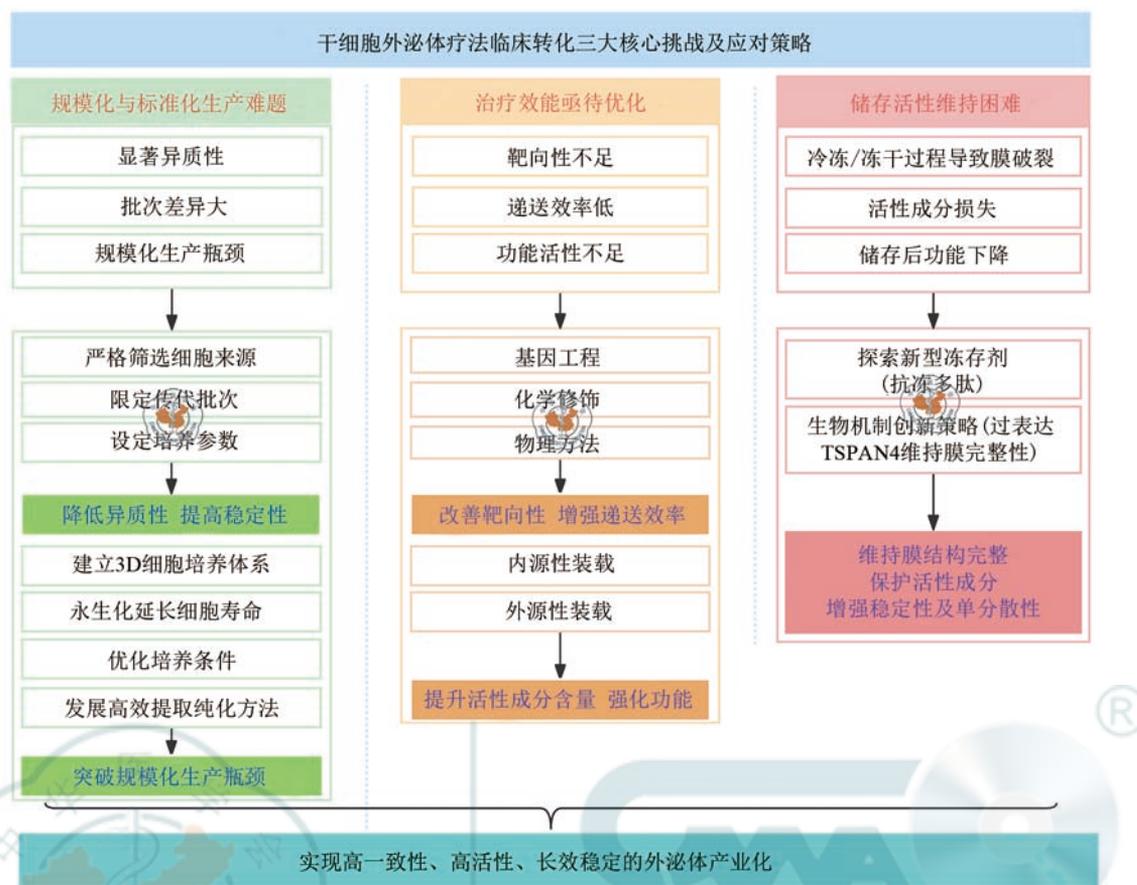


图1 干细胞外泌体疗法临床转化三大核心挑战及应对策略

本综述聚焦干细胞外泌体临床转化的核心挑战,提出细胞质控与规模化培养提升外泌体产量和均一性、工程化改造增强功能和开发革新低温保存体系3大应对策略,旨在推动其从“概念验证”迈向“标准化治疗”时代,为再生医学提供可临床应用的无细胞治疗方案。

## 1 干细胞外泌体: 无细胞治疗的新范式

### 1.1 干细胞治疗的潜力与局限

干细胞凭借自我更新与多向分化潜能,成为再生医学的革命性工具: 在组织修复领域,间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSCs)通过旁分泌作用促进血管生成<sup>[1]</sup>,加速心肌梗死后的心脏功能恢复<sup>[2]</sup>; 在免疫调控方面,干细胞可调节T细胞、B细胞及巨噬细胞活性,已应用于移植物抗宿主病(graft-versus-host disease, GVHD)和系统性红斑狼疮等自身免疫性疾病的治疗<sup>[3-4]</sup>; 干细胞在治疗SARS-CoV-2和流感病毒方面也展现良好的潜力<sup>[5]</sup>; 结合基因编辑技术(如CRISPR-Cas9),诱导多能干细胞可精准修正致病突变,分化为功能性细胞,治疗镰状细胞贫血等遗传病<sup>[6]</sup>; 抗衰老方向干细胞则通过清除衰老细胞和激活内源修复通路等机制延缓机体衰退<sup>[7]</sup>。截至2025年6月,全球干细胞临床试验超7500项,覆盖血液病和神经退行性疾病等几十种适应症。目前,全球已获批十多款干细胞药物,主要聚焦GVHD与退

行性疾病。2025年1月,中国首款脐带源MSCs(umbilical cord mesenchymal stem cells, UC-MSCs)药物艾米迈托赛注射液获批上市,专为治疗14岁以上消化道受累为主且激素治疗无效的急性GVHD,标志着中国干细胞治疗进入标准化时代。

尽管干细胞疗法前景广阔,但一些临床试验未能证实其疗效,凸显临床转化过程中的关键瓶颈: (1) 功能衰退与异质性: 传代过程中出现的干细胞衰老、表观遗传漂变及转录组异质性扩大,导致细胞功能下降<sup>[8]</sup>; (2) 规模化生产限制: 原代干细胞扩增能力有限,难以满足产业化需求; (3) 安全风险: 异体干细胞表达主要组织相容性复合体(major histocompatibility complex, MHC)-I分子,可激活宿主免疫排斥,而未分化残留细胞或基因编辑脱靶则存在形成畸胎瘤/肿瘤的风险(尤其在多能干细胞中)<sup>[9]</sup>; (4) 疗效标准化困境: 干细胞功能高度依赖特定微环境(如缺氧、炎症因子梯度),导致同一批次细胞在不同患者体内疗效差异显著<sup>[10]</sup>。正是这些严峻挑战,促使研究者转向探索规避活细胞应用限制的无细胞外泌体疗法。

### 1.2 干细胞外泌体作为替代疗法的兴起

面对干细胞疗法在功能衰退、规模化生产、安全风险及疗效异质性方面的核心瓶颈,外泌体疗法作为替代方案应运而生。干细胞分泌的外泌体是纳米级脂质囊泡(30~

150 nm),富含 miRNA、功能性蛋白及脂质等生物活性物质,充当细胞间通讯载体直接调控受体细胞<sup>[11]</sup>。这种“无细胞化”策略规避活细胞移植缺陷,同时递送干细胞核心功能物质,成为再生医学的新突破口。

外泌体疗法的革命性优势体现在3个方面:(1)安全性突破:其天然低免疫原性(几乎不表达 MHC-I/II)降低异体输注的免疫排斥风险,无细胞核与增殖能力,规避畸胎瘤形成和异位定植风险<sup>[12]</sup>;(2)高效工程化潜力:相较于复杂的细胞工程(需基因编辑、长期扩增筛选且存在脱靶风险),外泌体可通过电穿孔、化学偶联等简便方法直接修饰,或通过高效内源性改造(修饰亲本细胞)负载核酸/药物/CRISPR系统,大幅提升靶向性、递送效率及治疗功能<sup>[13]</sup>;(3)生产与临床应用便捷性:外泌体可长期冻存或冻干粉室温保存,生产工艺易于放大,且批次质量更易标准化监测,克服干细胞在液氮存储、存活率低、规模化生产局限及批次差异大等瓶颈。因此,外泌体有望成为干细胞疗法极具潜力的替代方案。

## 2 干细胞外泌体临床转化的关键挑战

尽管外泌体疗法在多个领域取得突破,然而,其临床转化进程仍面临3大核心瓶颈:规模化生产与标准化困境、治疗效能优化需求以及储存活性维持挑战。

首先,外泌体的临床转化面临制备标准化与规模化生产的双重挑战。一方面,外泌体存在异质性,不同细胞来源、供体差异(年龄、健康状况)及培养代次、生物环境等条件均导致其RNA组成与功能活性波动,为质量控制和标准化带来困难<sup>[14]</sup>。另一方面,产能瓶颈突出,原代干细胞2D培养扩增能力有限,难以满足规模化临床需求;主流分离技术各存局限,超速离心法(金标准)效率低、成本高和高剪切力易损伤外泌体膜结构;尺寸排阻色谱法虽能保持完整性与活性且操作简便,却不适合大量样本;聚合物共沉淀法可扩展性强但纯度低,混杂脂蛋白/核酸等杂质<sup>[15]</sup>。因此,突破细胞培养限制、提升产能、开发高效高纯度分离技术、有效降低异质性和提高批次稳定性,是实现外泌体疗法广泛应用亟待解决的关键问题。

其次,外泌体的治疗效能有待进一步提升。外泌体作为天然递送系统,其治疗效能取决于精准靶向递送效率及内容物的成分。在复杂病理微环境中,天然外泌体的器官趋向性仍显薄弱,亟需通过表面工程化修饰提升特异靶向能力。同时,天然外泌体所含的miRNA、功能蛋白等活性物质往往丰度不足,需借助基因编辑或装载包封等工程化手段增强其治疗功能。因此,双重工程化改造(靶向优化+内容物强化)是突破外泌体现有疗效不足、推动临床应用转化的关键路径。

再次,外泌体储存技术亟待突破。尽管《人源间充质干细胞外泌体制备与检验规范》(编号:T/FDSA 0049—2024)给出-80℃储存并避免反复冻融及温度波动的储存建议。但研究表明,在缺乏有效冻存保护剂的条件下,长期保存仍会导致外泌体膜结构破坏、颗粒聚集,且无法有效保护RNA

等活性成分<sup>[16]</sup>。当前冷冻保存技术的缺失已严重损害外泌体的生物活性和临床应用有效性,成为制约行业发展的关键技术瓶颈,亟需开发创新的外泌体保存方案。

## 3 干细胞外泌体临床转化挑战的应对策略

### 3.1 外泌体的异质性及产量限制问题

外泌体的异质性是制约其临床应用的核心瓶颈之一。这种异质性并非单一因素所致,而是细胞来源、供体特征、培养条件及微环境等多维度因素动态交织作用的结果,直接影响外泌体的内含物组成(如蛋白质、核酸、脂质)、功能稳定性(如免疫调节、组织修复)及临床疗效<sup>[17]</sup>。

#### 3.1.1 细胞来源与供体差异

许多研究证实,不同来源的MSCs生物学特性具有显著差异。例如,脂肪来源MSCs(adipose-derived mesenchymal stem cells, AD-MSCs)的增殖能力比骨髓MSCs(bone marrow mesenchymal stem cells, BM-MSCs)更强, BM-MSCs更倾向于向成骨细胞分化, AD-MSCs具有更高的血管生成潜力<sup>[18]</sup>。不同的细胞类型导致其分泌的外泌体异质性也被证实。研究表明, AD-MSCs外泌体具有显著的促血管生成优势,而 UC-MSCs外泌体的免疫调节能力更强<sup>[19]</sup>。另外,不同供体的外泌体在功能与分子特征上也存在差异。一项纳入13项研究的分析报告表明, MSCs外泌体在骨愈合方面均显示出优于对照组的效果,然而,研究之间的异质性和报告偏倚的可能性限制对获益程度的信心<sup>[20]</sup>。

#### 3.1.2 干细胞代次差异与表观遗传漂变

干细胞在连续传代过程中发生的代际差异与表观遗传漂变,是导致其功能异质性的另一核心驱动因素。随着传代次数的增加,干细胞会经历功能衰退(如增殖能力下降、分化潜能改变)及表观遗传模式的动态调整(如DNA甲基化、组蛋白修饰的变化),这种漂变扩大细胞亚群异质性,导致外泌体内容物和疗效的批次间波动<sup>[21]</sup>。并且,受限于传代次数,细胞持续产率不足制约外泌体产量提升,严重阻碍其规模化生产的可持续性。

#### 3.1.3 培养条件及微环境

近年研究发现,除细胞本身的生物学差异,细胞的培养参数及微环境也会影响外泌体表型。例如,外泌体内容物会随炎症信号的变化而改变,细胞内钙离子水平的升高、缺氧和酸性条件均会改变外泌体的分泌量和生物功能。而细胞培养的时间、培养基成分和剪切应力等参数的不同,也被证明会影响外泌体的特性<sup>[22]</sup>。

为提高外泌体生产过程中的均一性及产量,需从源头(细胞与供体)、过程(培养与工程化)和终点(质量控制)3个层面协同优化。因此,需严格限定细胞来源,根据临床需求选择表型稳定、功能一致的细胞类型(如 UC-MSCs用于免疫调节、AD-MSCs用于血管生成),避免因细胞来源混杂导致的外泌体功能异质性;建立供体筛选标准,减少供体间差异对外泌体分子特征的影响。需限制传代次数及批次,避免高代次细胞的功能退化;通过基因工程技术稳定表观

遗传状态,减少细胞亚群的异质性,确保外泌体内容物的一致性;也可建立永生化细胞系,提高干细胞的稳定性,突破传代瓶颈。系统优化细胞的培养参数,确定细胞接种密度、培养体系、培养基成分、pH值和氧浓度等微环境条件。最后,还需建立全流程质量监测体系,结合纳米颗粒跟踪分析(nanoparticle tracking analysis, NTA)、透射电镜、流式细胞术、组学检测及功能验证,定期对外泌体的理化性质、分子特征及功能进行检测,及时发现异质性波动。

### 3.2 有效和可扩展的外泌体生产策略

#### 3.2.1 大规模细胞培养创新系统

大规模的体外细胞培养是获取足够量外泌体的基础。平面2D细胞培养虽操作简便、成本较低,但细胞贴壁生长模式导致比表面积受限,单位体积细胞密度通常 $<(1.1 \sim 1.5) \times 10^6$ 个细胞/mL,难以满足临床级外泌体量产需求<sup>[23]</sup>。近些年发展的3D细胞培养体系,通过构建三维空间结构,模拟细胞间质相互作用及细胞外基质的力学信号传导,提升细胞分化潜能与趋化因子分泌量<sup>[24]</sup>;同时利用空间扩增优势,在微载体或固定床反应器中实现细胞密度突破性增长,产能较2D提升数十倍以上,为外泌体工业化生产提供核心支撑<sup>[25]</sup>。

生物反应器联合微载体技术是最常见的3D培养体系<sup>[26]</sup>。生物反应器有搅拌式生物反应器、固定床生物反应器、膜式生物反应器和气升式生物反应器等多种类型。将各类反应器的特点及优缺点总结在表1。

微载体材料选择多样,包括可生物降解的水凝胶、壳聚糖和透明质酸等聚合物<sup>[27]</sup>。如清华大学团队采用自主研发的3D TableTrix™微载体片,在1L生物反应器中,AD-MSCs 7d扩增500倍,细胞收获量达到 $1.05 \times 10^9$ 个细胞,微载体降解后细胞回收率高达 $(98.6 \pm 0.1)\%$ ,活性 $>90\%$ 。该技术可放大至15L规模,单批次产量达 $2 \times 10^{10}$ 个细胞(1975倍扩增),并通过自动化收获装置(3D FloTrix® vivaPREP)实现制剂化<sup>[28]</sup>。另一研究利用基于同步光学相干层析技术打印的海藻酸钠-明胶水凝胶支架(具4级仿生结构),实现胚胎干细胞4d扩增11.4倍,产量达 $2 \times 10^8$ 个细胞/次(满足临床单次移植量需求)<sup>[29]</sup>。

多项研究证实,3D培养技术可提升干细胞外泌体产量

及功能。例如,Haraszti等<sup>[30]</sup>使用微载体3D培养细胞系统,外泌体产量达2D培养的20倍,结合切向流过滤后,产量进一步增至3D离心的7倍。中空纤维生物反应器的外泌体产率是2D培养的7.5倍<sup>[31]</sup>。3D打印支架-灌注生物反应器系统使MSCs外泌体产量提升40~80倍。并且,灌注系统产生的外泌体改善糖尿病小鼠伤口愈合,与2D产生的MSCs外泌体相比,伤口组织中的CD31<sup>+</sup>染色增加,提示血管生成增强<sup>[32]</sup>。因此,3D细胞培养可突破外泌体规模化产能瓶颈,其产物在组织再生(如软骨修复、伤口愈合)中展现更优治疗潜力。

#### 3.2.2 永生化技术延长细胞寿命

干细胞虽然具有自我更新和多向分化潜能,但其传代过程中的异质性和衰老问题是再生医学和细胞治疗领域的核心挑战。研究表明,干细胞随着传代次数的增加,传代过程中DNA复制错误、表观遗传修饰(如DNA甲基化、组蛋白修饰)失调,导致子代细胞基因表达谱分化,形成功能差异,导致异质性的加剧<sup>[21]</sup>。另外,原代干细胞随着传代增加展现出干细胞衰老性质,表现为增殖减缓和干性减弱等现象<sup>[33]</sup>。异质性增加和有限的培养寿命极大的增加体外细胞培养成本并影响其功能均一化,也成为限制干细胞外泌体临床转化的重要挑战。建立永生化或抗衰老的细胞系,不仅可以保证细胞的增殖速率,还可降低批次异质性,保证外泌体临床应用的供应和均一化。

基因编辑介导永生化是最常用的方法。端粒酶逆转录酶(human telomerase reverse transcriptase, hTERT)可以维持甚至增加端粒长度,防止细胞衰老。例如,慢病毒载体导入hTERT基因至人BM-MSCs,平均端粒长度从9.2 kb增至18.6 kb,突破复制性衰老限制,对照组MSCs在26代后衰老停滞,而MSC-hTERTs持续增殖超260代( $>2.5$ 年),在连续传代培养过程中,细胞保持成骨细胞标记物的产生和分化潜力,不形成肿瘤,核型正常<sup>[34]</sup>。猿猴空泡病毒40(simian virus 40, SV40)基因,特别是大T(large T, LT)抗原,可抑制肿瘤蛋白p53和视网膜母细胞瘤蛋白(retinoblastoma protein, pRb)通路,阻断细胞周期停滞,促进细胞连续分裂和生长。多项研究表明,引入SV40-LT基因可诱导人BM-MSCs、牙髓干细胞(dental pulp stem cells, DPSCs)稳

表1 常用生物反应器类型及优缺点

生物反应器类型	核心结构/原理	关键优势	主要局限
搅拌式生物反应器	机械搅拌桨驱动培养液与微载体混合	混合效率高,均质性好;易联用微载体,兼容性强;支持高细胞密度(达 $1 \times 10^7$ 个细胞/mL)	剪切力可能造成细胞损伤,需优化桨叶设计(如螺旋桨式)与转速控制策略
固定床式生物反应器	细胞贴附于多孔载体(如海绵状基质)内部生长	提供低剪切力环境,适合脆弱细胞(如神经干细胞);载体稳定性高,利于长期培养	载体内部易形成营养/氧气梯度,导致深层细胞坏死风险升高;载体清洗与细胞回收困难
气升式生物反应器	底部通入气体驱动培养液循环(无机械搅拌)	剪切力极低,细胞存活率高;结构简单,不易污染	大规模培养时氧传输效率不足(气泡对氧溶解能力有限);循环控制精度要求高
膜式生物反应器(中空纤维)	模拟毛细血管结构,利用选择性渗透膜实现物质交换	维持稳态微环境,保护细胞活性;高效回收高质量外泌体;工艺重复性好,易放大生产	膜污染可能导致通量下降,需定期维护;初始设备投资成本高

定连续传代 50 代未现衰老<sup>[35-36]</sup>。除此之外,来自人乳头瘤病毒的癌蛋白,如 E6 和 E7,可以抑制 p53 和 pRb 这类肿瘤抑制途径,促进细胞周期进展和延长细胞增殖寿命。细胞 MYC 原癌基因阻断 p53 的促凋亡活性,允许细胞逃避程序性细胞死亡,即使存在 DNA 损伤也能继续增殖<sup>[37]</sup>。

永生化学细胞系,克服原代干细胞寿命短和衰老等局限性,允许大量生产具有质量和效力一致性的外泌体。多项研究已经验证永生化学 MSCs 外泌体的治疗功效<sup>[38-40]</sup>。因此,建立永生化学干细胞系,是有效解决外泌体产能不足和质量一致性差的路径之一。

### 3.2.3 优化培养条件提升外泌体产量

除了大规模的细胞培养,优化特定培养成分也能提升外泌体产量。例如:培养基中添加抗转化生长因子- $\beta$  (transforming growth factor- $\beta$ , TGF- $\beta$ ) 单域抗体(通常与  $\beta$ -巯基乙醇联用),该抗体通过阻断 TGF- $\beta$  信号通路(一种影响细胞行为的关键因子),经由反馈机制诱导 MSCs 增强外泌体分泌,使产量提升 1.5 倍以上(CN202411441316)。DMEM/F12 培养基、无外泌体血清、5'-腺苷酸、丝切蛋白-1、膜联蛋白 V、L- $\alpha$ -磷脂酰丝氨酸和 N-乙酰氨基葡萄糖的培养基,不仅可维持 MSCs 长期培养达到 15 ~ 20 d,并能持续刺激外泌体的分泌,其分泌量是常规收集方法的 20 ~ 30 倍(CN117844747A)。

物理与化学刺激也是大幅提升外泌体产量的有效策略。多项研究证实,机械刺激通过激活特定信号通路增强细胞的外泌体分泌。Guo 等<sup>[41]</sup>报道,将 DPSCs 和 AD-MSCs 接种于 3D 支架,并施加流速为 0.5、1.0 mL/min 的流动刺激,其外泌体产量分别提升至对照组的 24 倍和 37 倍;骨骼肌细胞施加 25 % 应变、1 Hz 的循环拉伸刺激,外泌体产量增加 11 倍;该效应由 Yes 关联蛋白(yes-associated protein, YAP)机械敏感通路介导,使用 YAP 抑制剂可完全阻断分泌增强,证实 YAP 的核心作用。Wang 等<sup>[42]</sup>报道牙周韧带细胞在循环拉伸 24 h 后,外泌体分泌量相比静态培养提高 30 倍。声波与电刺激同样有效。使用 4 W、10 MHz 的超声波照射,可

使外泌体的产量增加 8 ~ 10 倍。应用 0.34 mA/cm<sup>2</sup> 的电场刺激小鼠黑色素瘤细胞和小鼠成纤维细胞 60 min,在维持细胞活力和颗粒分布的同时,外泌体分泌率提高 1.7 倍<sup>[43]</sup>。

环境因素调控是另一重要方法。中度缺氧处理(0.5 % ~ 1 % 氧气),可轻微增强 MSCs 的外泌体释放<sup>[44]</sup>。另外,低 pH 值也会促进外泌体的释放。研究证实,AD-MSCs 细胞释放的外泌体以及由此产生的 miRNA-136-5p 水平在 pH 值 6.8 时高于 pH 值 7.4<sup>[45]</sup>。

### 3.2.4 发展高效外泌体提取纯化方法

外泌体的提取和纯化工艺的优化是未来外泌体临床应用发展的关键。目前常见的外泌体提取方法包括超速离心法、密度梯度离心法、免疫亲和法、聚合物沉淀法、尺寸排阻法和超滤法等。每种方法各有优缺点(表 2)<sup>[46]</sup>。综合来看这些方法都无法同时解决纯度、得率和特异性的平衡,需根据研究目的进行选择。

这里,介绍几种在纯度、回收率、通量及自动化程度上均有突破的外泌体提取纯化创新技术(表 3)。

超声纳滤技术(EXODUS 系统)是汇芯生物研发的全自动外泌体提取系统。其核心技术是将负压振荡和双耦合超声振荡系统作用于纳米超滤芯片上,样本中的游离核酸与蛋白等杂质通过纳米孔快速去除并截留外泌体,实现外泌体的富集和纯化。该系统可实现全自动的外泌体收集,支持微量样本(如泪液、脑脊液)至升级规模的外泌体提取,杂质去除效率 > 99 %,回收率 > 90 % (<http://www.huixinbio.com/home/product/exodus.html>)。Cytiva 公司开发新一代的 Cytiva<sup>TM</sup> superSEC 填料,结合切向流和尺寸排阻富集纯化外泌体。Cytiva<sup>TM</sup> SuperSEC 填料通过高分辨率尺寸排阻与优化的流体动力学特性,缩短尺寸排阻层析循环时间并提升杂质去除效率,其与切向流联用的工作流程不仅能温和、高效富集外泌体,还可通过重复循环实现大体积样本处理,相比传统填料 Sepharose<sup>TM</sup> CL-2B,该方案纯度指数更高、工艺灵活性更强,为外泌体规模化生产与临床应用提供可靠解决方案(<https://www.cytivalifesciences.com.cn/zh/cn/solutions/>)

表 2 当前常用外泌体提取技术的原理及优缺点

分离方法	原理	优点	缺点
超速离心法	利用不同离心力分步去除细胞、碎片及大囊泡,最终高速沉淀外泌体	标准方法,适用大体积样本量;操作简单,无需特殊试剂	耗时较长;设备昂贵;外泌体易破损;不适用于微量样本
密度梯度离心法	在超速离心基础上,通过蔗糖/碘克沙醇形成密度梯度,利用外泌体与其他颗粒的密度差异进行分离	纯度高;有效去除蛋白污染	耗时较长;设备昂贵;回收率低;操作复杂
聚合物沉淀法	亲水聚合物与外泌体相结合,形成疏水层,降低其溶解度,低速离心即可沉淀	操作简单,无需超离设备;适用各类体积样本	蛋白质等杂质多;聚合物残留干扰下游分析
尺寸排阻色谱法	多孔凝胶柱按分子粒径尺寸分离,大分子外泌体先洗脱	保留完整结构与活性;纯度高,蛋白污染少	步骤繁琐,需多步离心、过滤;耗时长;柱材成本高、易堵塞;不适合大量样本处理
免疫亲和法	抗体修饰磁珠特异性结合外泌体表面标志物(如 CD63/CD81)	特异性高,适合亚群研究;纯度高,降低蛋白等杂质干扰	抗体成本高;不适合大量样本处理;抗体结合可能损伤功能活性
超滤法	超滤膜截留外泌体,滤除小分子	成本低;耗时短;适用各类体积样本	纯度低;膜吸附和堵塞导致外泌体损失;剪切力致结构变形

表3 近期外泌体提取纯化创新技术

技术名称	核心原理/技术	关键优势	应用场景/特点
超声纳滤技术(EXODUS系统, 汇芯生物)	负压振荡 + 双耦合超声振荡作用于纳米超滤芯片, 快速去除游离核酸/蛋白杂质并截留外泌体	全自动操作; 支持微量样本(泪液、脑脊液)至规模化样本提取; 杂蛋白去除效率 > 99%; 回收率 > 90%	适用于需要高纯度、高回收率且样本量波动大的研究或临床场景
Cytiva™ superSEC 填料(切向流联用, Cytiva 公司)	高分辨率尺寸排阻层析 + 优化流体动力学设计, 结合切向流富集	缩短层析循环时间; 提升杂质去除效率; 纯度指数高于传统填料(如 Sepharose™ CL-2B)	为外泌体规模化生产与临床应用提供可靠解决方案(如生物制药级外泌体纯化)
微流控技术 <sup>[47-48]</sup>	分离型: 双切向流 + 两种孔径纳米多孔膜; 检测型: 化学发光检测 + 杂交链反应	微量样本处理(如临床少量血液)、高活性外泌体获取; 高灵敏度外泌体多靶标 miRNA 检测	适用于临床即时诊断(如肿瘤标志物外泌体快速检测)、微量样本的高精准分离
细胞内泌体提取 <sup>[49-50]</sup>	低温“冷萃”裂解 DPSCs 细胞, 直接分离内泌体	提取效率是外泌体的 16 倍; 碱性成纤维细胞生长因子、脑源性神经营养因子、表皮生长因子受体等生长因子含量高于外泌体; 低成本、操作简单	为细胞囊泡高效提取提供新思路(如干细胞来源囊泡的低成本制备), 适用于再生医学研究

cell-therapy/knowledge-center/resources/exosome-isolation-in-a-scalable-workflow-for-purification-of-exosomes-using-tff-and-sec)。微流控技术通过微米级通道设计对液体进行精准调控, 在微量样本处理、高活性外泌体获取及临床即时诊断场景中具有独特的应用价值。Hua 等<sup>[47]</sup>设计一种基于双切向流的微流控分离装置, 结合双切向技术与两种孔径的纳米多孔膜, 实现对 30 ~ 200 nm 外泌体的高效分离与富集。Peng 等<sup>[48]</sup>开发一种创新的微流控芯片设计, 它结合化学发光检测和杂交链反应技术, 用于乳腺癌外泌体多靶标 miRNA 的检测, 可以更加高灵敏度、更准确的分析不同类型外泌体 miRNA。Duan 等<sup>[49]</sup>和 Ye 等<sup>[50]</sup>从 DPSCs 裂解液中首次分离出一种新型囊泡, 命名为细胞内泌体。他们发现无论在形态、大小、蛋白标记物方面内泌体与外泌体高度相似, 并且其内碱性成纤维细胞生长因子、脑源性神经营养因子和表皮生长因子受体等多种生长因子的含量高于外泌体。内泌体的提取全程在低温下进行“冷萃”, 结果发现内泌体的提取效率是外泌体的 16 倍, 该研究为高效提取细胞囊泡提供一种低成本的新思路。

### 3.3 外泌体工程化改造增强功能

外泌体的治疗效能主要取决于两大核心要素: 靶向递送效率和所携带的生物活性物质(如 miRNA、mRNA、蛋白质和脂质)治疗效力。尽管在模拟生理条件的体外实验中, 天然外泌体可能表现出一定的趋向性, 但在体内复杂的病理微环境下(如实体瘤的异常血管化、致密基质屏障、炎症部位高通透性血管或特定器官的生理屏障), 其固有的、未经修饰的靶向能力往往薄弱且非特异性。因此, 提升病理条件下外泌体的特异性靶向递送能力, 是突破其临床应用瓶颈的关键所在。此外, 天然外泌体其携带的治疗性分子(如 miRNA、蛋白质)含量通常较低, 难以产生显著且持续的治疗效果。为了赋予外泌体更强的治疗功能, 必须通过主动的工程化改造对其内容进行精准操控和强化(图 2)。

#### 3.3.1 外泌体的靶向性优化策略

表面工程化修饰是提升外泌体稳定性和靶向性的常用策略, 主要包括基因工程、化学修饰和物理方法。其中, 基

因工程通过对供体细胞或外泌体进行基因编辑, 将靶向肽或抗体片段融合表达于溶酶体相关膜蛋白 2b (lysosomal-associated membrane protein 2b, Lamp2b)、CD63 等跨膜蛋白上, 从而使外泌体表面展示特定分子, 实现精准定位<sup>[51]</sup>。例如, 狂犬病病毒糖蛋白肽修饰的外泌体可靶向神经乙酰胆碱受体, 提升脑部递送效率<sup>[52]</sup>。Zheng 等<sup>[53]</sup>将唾液酸化 LewisX 抗原 (sialyl Lewis X, sLeX) 糖基化位点融合表达在 CD63 的胞外段上, 从而使外泌体表面修饰 sLeX, 使修饰后的外泌体特异性靶向结肠炎小鼠模型中结肠上皮细胞。Du 等<sup>[54]</sup>团队通过构建过表达“别吃我”信号蛋白 CD47 的外泌体, 有效减少单核吞噬细胞系统的清除, 增强其在肝脏血窦内皮细胞的靶向积累, 改善小鼠肝损伤治疗效果且未观察到不良反应。基因工程的优势在于修饰分子表达稳定, 但其技术相对复杂且周期较长。

化学修饰是除基因工程外另一类常用的外泌体表面工程化策略, 主要利用外泌体膜分子的特定官能团(如氨基、巯基、羧基和醛基)或脂质双层的疏水性进行修饰。(1) 基于官能团的共价修饰: 通过化学反应使修饰分子(如肽、抗体、适配体、聚合物、小分子药物和荧光染料)上的互补官能团与外泌体表面的官能团形成共价键。例如, Geng 等<sup>[55]</sup>利用巯基-马来酰亚胺反应, 将环状精氨酸-甘氨酸-天冬氨酸-酪氨酸-半胱氨酸肽共价连接到外泌体表面, 使其能特异性靶向胶质母细胞瘤细胞过表达的整合素  $\alpha v \beta 3$  受体, 从而增强外泌体的肿瘤靶向能力;(2) 基于疏水相互作用的膜插入: 利用修饰分子末端的疏水性基团(如磷脂衍生物)自发插入到外泌体的脂质双层膜中。最常用的锚定分子是二硬脂酰基磷脂酰乙醇胺-聚乙二醇 [1,2-Distearoyl-Sn-Glycero-3-Phosphoethanolamine-Poly (ethylene glycol), DSPE-PEG], 其疏水性 DSPE 部分嵌入脂质双层以固定分子, 亲水性 PEG 链则减少非特异性蛋白吸附, 同时可连接靶向配体。Fan 等<sup>[56]</sup>合成 DSPE-PEG-抗-CD40 和 DSPE-PEG-PLGVA-抗-PD-L1, 通过疏水插入将其修饰于外泌体表面。这种设计将靶向递送(针对肿瘤微环境)与免疫检查点阻断(抗 CD40 和抗 PD-L1)相结合, 有效提升抗肿瘤治疗效果。

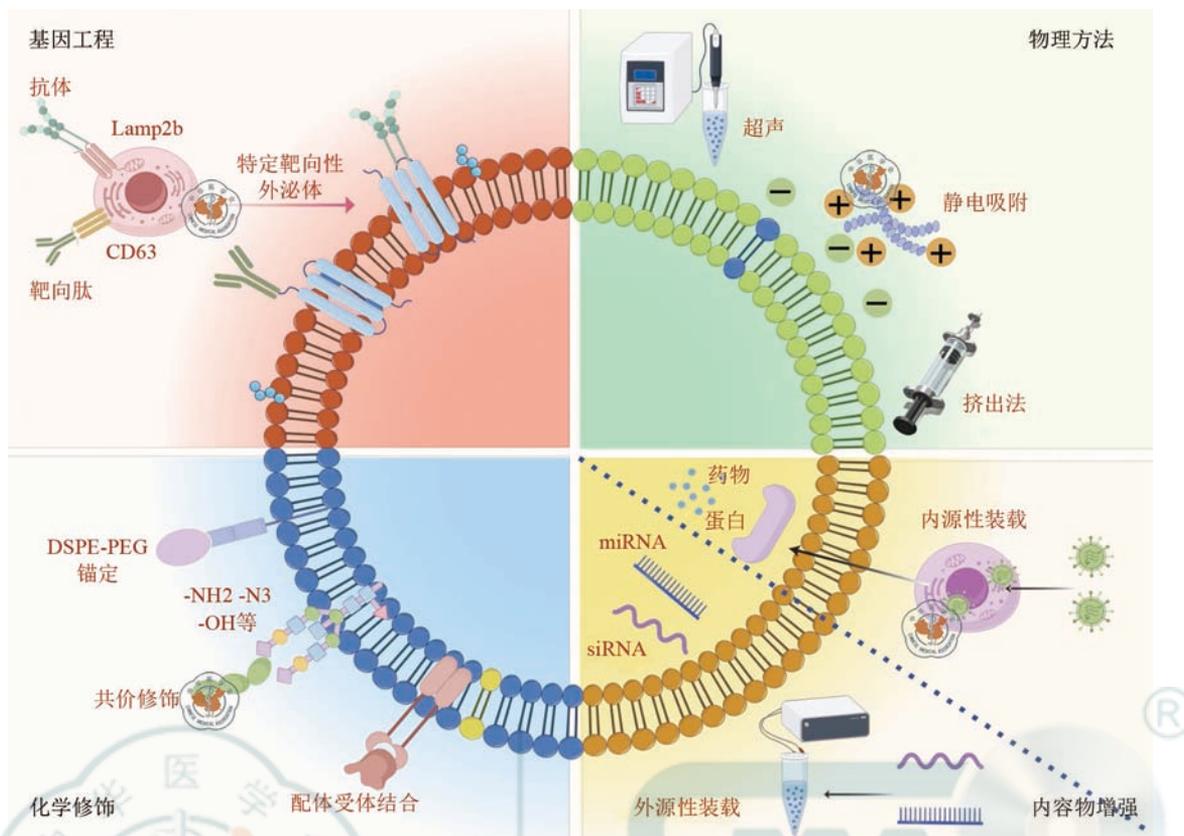


图2 外泌体工程化改造策略(本图由 Figdraw 绘制)

物理修饰是利用非共价相互作用或物理力介导实现外泌体表面功能化。典型策略包括分子自组装,例如,Zhan等<sup>[57]</sup>通过静电相互作用将阳离子脂质敏感的内吞肽 L17E 定位在外泌体表面,增强其肿瘤靶向潜力。物理力是借助超声处理、电穿孔或挤压等物理手段对外泌体进行改造或负载。

### 3.3.2 外泌体内容物强化策略

外泌体作为天然递送载体,通过其携带的生物活性内容物调控靶细胞功能,并可作为药物递送系统进行药物负载与递送。利用生物工程技术改造其内容物,可增强其治疗效果,主要策略包括内源性装载和外源性装载。

内源性装载通过基因工程或生物学手段改造亲代细胞,使其产生携带特定功能分子的外泌体。例如,Zhou等<sup>[58]</sup>构建稳定过表达 miR-320a 的人胚胎肾 293 细胞系,从中提取的工程化外泌体增强 miR-320a 的递送,进而强化顺铂对 HeLa 细胞生长的抑制作用。Huang等<sup>[59]</sup>将 miR-31-5p 转染至 293T 细胞,获得的工程化外泌体有效递送该 miRNA,促进血管生成、胶原沉积及上皮再生。此外,通过调控细胞培养环境(如缺氧)也能改变外泌体的性质。Shi等<sup>[60]</sup>发现缺氧处理 BM-MSCs 释放的外泌体富含 miR-4645-5p,该外泌体通过递送 miR-4645-5p 抑制角质形成细胞中丝氨酸-苏氨酸激酶-哺乳动物雷帕霉素复合物 1 信号通路,从而加速糖尿病伤口愈合。

外源性装载是指从亲本细胞分离出天然外泌体后,采用物理或化学方法(如共孵育、电穿孔、超声和膜融合等)直接

向其内部载入治疗分子。相较于基于亲代细胞的工程化改造(内源性装载),该方法操作更为简便快捷。电穿孔和超声处理能有效的将 miRNA、siRNA 或小分子药物等负载入外泌体。例如,Chen等<sup>[61]</sup>通过电转染将腺苷激酶 siRNA 加载到 klotho 外泌体中。荧光检测和流式细胞术结果表明,外泌体内的 siRNA 能够成功转染到内皮祖细胞中,并能保持稳定培养长达 4 d。中科院团队开发“外泌体纳米穿孔器”技术。该技术利用 3 万个并行纳米通道,在外泌体膜上瞬时形成纳米孔,实现阿霉素等药物的高效装载。其优势在于避免传统电穿孔对膜结构的破坏,在提升装载效率的同时,完整保留外泌体的结构完整性和活性<sup>[62]</sup>。韩国团队近期开发基于立方体脂质纳米颗粒的膜融合技术,利用立方体脂质纳米颗粒独特的正高斯曲率特性,该技术能在 10 min 内高效完成与外泌体膜的融合,实现 mRNA(装载效率达 98%)和抗体(装载效率达 89%)等大分子的高效递送,其融合速度比传统脂质体快 72 倍<sup>[63]</sup>。

### 3.4 外泌体的保存技术

外泌体的储存稳定性是保障其样本稳定性和生产批间一致性的关键因素。研究表明,储存条件(如缓冲液成分、温度和冻融循环)会影响外泌体的理化特性(分散性、颗粒浓度和膜完整性)和生物学功能<sup>[64]</sup>。目前,磷酸盐缓冲液结合 -80 °C 冷冻仍是实验室和临床常用的储存方案。然而,研究证实磷酸盐缓冲液本身无法有效保护外泌体稳定性:长期磷酸盐缓冲液储存导致外泌体回收率降低,且反复冻融过

程中产生的冰晶损伤会进一步破坏外泌体结构和功能<sup>[64]</sup>。4℃储存仅适用于极短期(≤7d)保存,长期存放易引发外泌体聚集、膜破裂及生物活性丧失<sup>[65]</sup>。鉴于缺乏普遍且可靠的优化储存方案,2018年国际细胞外囊泡协会指南明确指出,不再对外泌体的具体储存条件做出统一建议,强调需根据研究目的和样本特性谨慎选择并明确报告储存细节<sup>[66]</sup>。

为解决外泌体储存稳定性难题,近年研究聚焦于在磷酸盐缓冲液中添加冷冻保护剂,如二甲基亚砜、甘油和海藻糖。这些传统保护剂主要通过调节渗透压平衡、稳定生物分子及膜结构、抑制冰晶形成,减轻冷冻过程对外泌体的机械损伤。例如,10%和20%的二甲基亚砜可保存样本中一定比例的外泌体使其大小和形态维持稳定<sup>[67]</sup>。含4%乳糖和2%海藻糖的外泌体冻干制剂,在常温储存1个月后,其形貌和分散度仍与-80℃保存组相当<sup>[68]</sup>。然而,传统保护剂存在局限,高浓度保护剂(如二甲基亚砜)残留具有潜在生物毒性。海藻糖虽有效,但其低溶解度和膜通透性差的特性可能导致渗透性应激反应,限制其应用。因此,开发兼具高安全性、高效能的新型冷冻保护技术,仍是当前亟待解决的关键问题。

为应对传统冷冻保护剂的局限,外泌体冻存稳定性研究正转向基于生物机制的创新策略。Ji等<sup>[69]</sup>发现 Tetraspanin 蛋白家族(如 TSPAN4)通过胆固醇依赖的膜微域组装,在外泌体抵抗冷冻损伤中起核心作用。过表达 TSPAN4 可抑制冷冻过程中的脂质相变,维持外泌体膜完整性。过表达

TSPAN4 的 L929 细胞来源的外泌体,在经历 30 次冻融循环后仍能几乎完全恢复其结构和功能;而来自 TSPAN4 敲除细胞的外泌体仅能耐受约 10 次循环。该策略提供一种内源性、无化学毒性残留且能显著提升冻融耐受性的新途径。

抗冻多肽是一类通过高效抑制冰晶重结晶来维持生物材料低温稳定性的生物活性物质。其核心功能源于独特的α/β螺旋结构:该结构表面有序排列的氨基、甲基和羟基基团可与冰晶形成氢键,提高冰晶生长的 Gibbs 自由能垒,从而有效抑制冰晶生长并调控其形貌。相较于依赖化学渗透压的传统冻存剂,抗冻多肽通过物理吸附冰晶及潜在的膜保护机制实现低抗冻损伤,具有高生物安全性和高效冰晶抑制能力的核心优势。因此,开发基于抗冻多肽的新型外泌体冻存剂,被视为极具潜力的突破性研究方向。

### 3.5 外泌体质量控制五维体系

外泌体的质量控制是通过标准化细胞来源、严格工艺控制、多维度标志物验证及批次一致性评价,确保其物理特性、内容物组成和功能活性的可重复性,以满足临床转化要求的系统性工程。也是确保其产品质量、性能稳定可靠及实验结果准确性的关键环节。提出“五维质量控制体系”构想,涵盖从源头到终产品的全链条质控,确保安全性、均一性及可追溯性(图3)。

#### 3.5.1 原材料来源与细胞质量控制

严格评估供体的健康状况,避免供体因素导致干细胞质

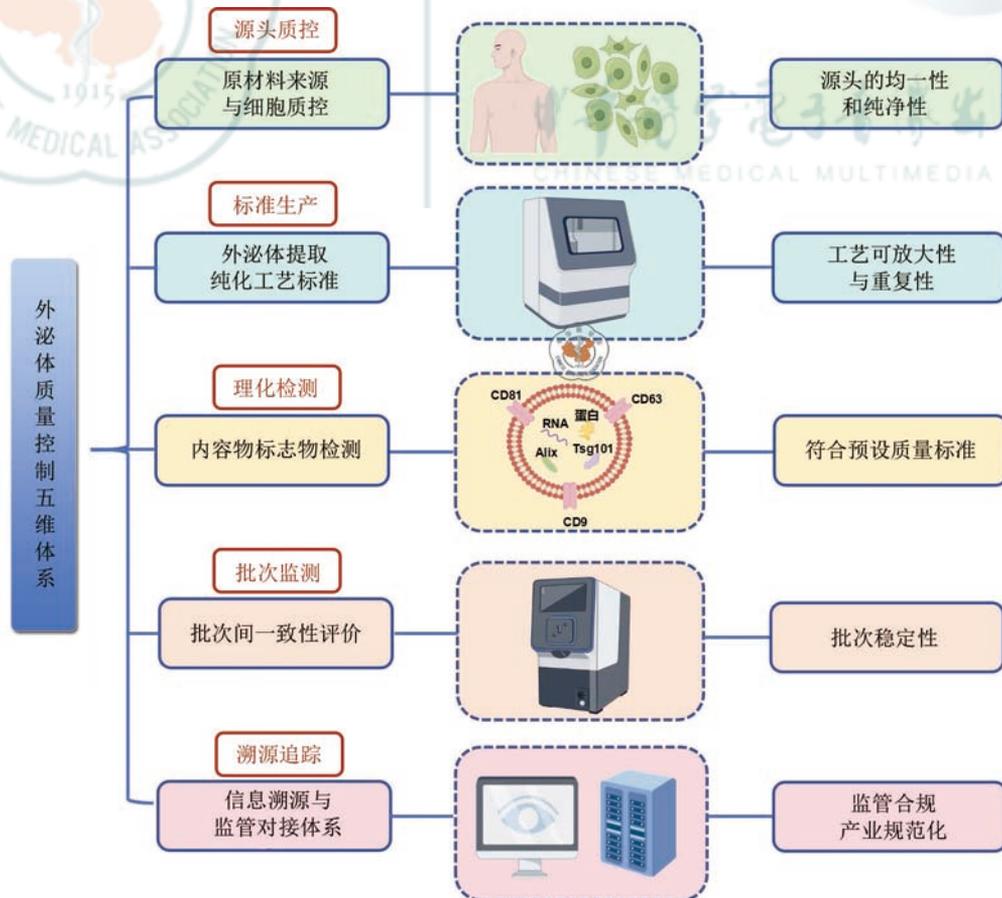


图3 外泌体质量控制五维体系

量异常。建立完整的细胞采集档案,实现干细胞从采集到使用的全链条溯源,确保其来源可控。采集过程需遵循标准化操作流程避免细胞受到外源性因素污染。明确传代批次,定期监测DNA甲基化、干细胞的干性能力。通过对细胞来源的严格监测,确保外泌体源头的均一性和纯净性。

### 3.5.2 外泌体提取纯化工艺标准

外泌体的制备应符合《药品生产质量管理规范》中的要求,在药品生产质量管理规范标准的实验室进行,对所涉及的物料、环境、检验、制备和人员等生产全过程进行记录保存。建立外泌体提取和纯化的标准化操作流程,工艺标准需明确关键参数的严格控制,如离心转速、时间和滤膜孔径等,避免因参数波动导致的外泌体损失或纯度不达标。此外,标准化工艺还需兼顾回收率与纯度的平衡,实现“高纯度、高回收率”目标,确保工艺可放大性与重复性。

### 3.5.3 内容物标志物检测

内容物标志物检测是评价外泌体质量的关键指标。通用检测的标志物包括:CD9、CD63以及CD81跨膜蛋白;Alix、Tsg101、HSP70细胞溶质蛋白;Calnexin、Histone 3以及GM130非外泌体成分的阴性标志蛋白,需满足至少3个阳性蛋白(包括至少1个跨膜蛋白和1个细胞溶质蛋白)和1个阴性蛋白标志物。特定内容物检测:用ELISA和qPCR检测特定蛋白质及核酸内容物的表达水平,确保其符合预设的质量标准。

### 3.5.4 批次间一致性评价

批次间一致性是外泌体产品稳定性与可靠性的核心指标。评价指标包括:(1)物理特性:用NTA检测外泌体的粒径分布、浓度;(2)膜标志物:用流式细胞术检测CD63、CD81等外泌体特征性膜蛋白质的阳性率;(3)内容物标志物:用Rt-qPCR或ELISA检测特定核酸或蛋白质的含量;(4)功能活性:用细胞实验验证外泌体的生物学效应。通过建立检测标准,评价不同批次质量。

### 3.5.5 信息溯源与监管对接体系

信息溯源与监管对接体系是外泌体产品质量的最后防线,需建立全流程可追溯记录机制(涵盖细胞信息:供体来源、培养条件;分离纯化工艺:培养体系参数、过滤步骤;检测数据:浓度、粒径、标志物含量等),并通过符合药品生产质量管理规范,与美国食品药品监督管理局、(中国)国家药品监督管理局等监管部门对接(定期提交质量报告、接受现场检查)实现监管合规。该体系可增强产品可信度,保障外泌体产业规范化发展,满足临床与科研需求。

## 4 小结与展望

干细胞外泌体作为无细胞治疗的新范式,在规避活细胞移植风险的同时,通过工程化改造与规模化生产策略展现出巨大的临床转化潜力。然而,其发展仍面临3大核心挑战,规模化生产与标准化困境:外泌体的异质性和低效分离技术制约规模化生产。治疗效能优化需求:天然外泌体的靶向性弱、活性内容物丰度不足,需通过工程化修饰提升递送

效率与功能。储存活性维持难题:传统 $-80^{\circ}\text{C}$ 冷冻或冻干易导致膜结构损伤和RNA降解,亟需开发新型保护技术。

针对上述挑战,本综述提出系统性的解决方案。采用3D生物反应器(如微载体技术)联合永生化细胞系(如hTERT基因编辑),扩大干细胞培养规模和寿命限制,提升外泌体产量,并保障批次稳定性;通过基因工程、化学修饰及内容物装载,增强靶向性与治疗活性;探索新型冻存剂(如抗冻多肽抑制冰晶)和抗冻机制(如过表达TSPAN4维持膜完整性),突破长期活性保存瓶颈。

未来,干细胞外泌体临床转化应建立涵盖细胞来源、培养工艺、分离方法的动态药品生产质量管理规范质控标准,推动外泌体从“实验室定制”迈向“工业化生产”;探索内源性装载(如CRISPR编辑亲本细胞)与外源性修饰(纳米穿孔载药)的协同优化,实现多功能一体化治疗平台;注重与新技术的融合,例如,结合多组学分析(蛋白组、转录组、代谢组等)深度解析外泌体分子组成与功能活性,建立成分-功能关联图谱,为“精准功能评价”提供客观生物学依据;通过机器学习算法整合形态、粒径和标志物等多维数据,实现高通量、自动化和智能化的批次稳定性监控,突破传统质量控制的标准化的瓶颈;建立标准化数据库,通过整合多组学、临床疗效及生产工艺数据,形成产业通用的质量标准与参考体系,促进不同研究间“机制关联验证”的一致性,解决产业化中因标准不统一导致的结果差异问题。随着技术创新与监管框架完善,干细胞外泌体有望从“概念验证”迈向“标准化治疗”,为再生医学提供可复现、高安全的无细胞治疗方案。

## 参 考 文 献

- 1 闫永利,叶进培. hESC 衍生间充质干细胞可显著促进体外血管生成[J]. 中国细胞生物学学报, 2021, 43(8):1561-1573.
- 2 Hughey CC, Ma LL, James FD, et al. Mesenchymal stem cell transplantation for the infarcted heart: therapeutic potential for insulin resistance beyond the heart[J]. Cardiovasc Diabetol, 2013, 12:128.
- 3 Ringdén O, Uzunel M, Rasmusson I, et al. Mesenchymal stem cells for treatment of therapy-resistant graft-versus-host disease[J]. Transplantation, 2006, 81(10):1390-1397.
- 4 Zeng LT, Liu C, Wu Y, et al. Efficacy and safety of mesenchymal stromal cell transplantation in the treatment of autoimmune and rheumatic immune diseases: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials[J]. Stem Cell Res Ther, 2025, 16(1):65.
- 5 Datta N. Stem cell therapy for SARS-CoV-2 and influenza virus infections[J]. BIO Integration, 2024, 5(1):1-13.
- 6 Huang XS, Wang Y, Yan W, et al. Production of gene-corrected adult beta globin protein in human erythrocytes differentiated from patient iPSCs after genome editing of the sickle point mutation[J]. Stem Cells, 2015, 33(5):1470-1479.
- 7 Liu N, Matsumura H, Kato T, et al. Stem cell competition orchestrates skin homeostasis and ageing[J]. Nature, 2019, 568(7752):344-350.
- 8 Mejia-Ramirez E, Geiger H, Florian MC. Loss of epigenetic polarity is a hallmark of hematopoietic stem cell aging[J]. Hum Mol Genet, 2020, 29(R2):R248-R254.
- 9 Bolton EM, Bradley JA. Avoiding immunological rejection in

- regenerative medicine[J]. *Regen Med*, 2015, 10(3):287-304.
- 10 Andersen MS, Jensen KB. Stem cell heterogeneity revealed[J]. *Nat Cell Biol*, 2016, 18(6):587-589.
- 11 Cao Q, Zhang R, Ye Q. Association and enterprise standard for producing and monitoring of quality extracellular vesicles/exosomes derived from human mesenchymal stem cells[J]. *Nano Trans Med*, 2024, 3:100058.
- 12 Tan F, Li XR, Wang Z, et al. Clinical applications of stem cell-derived exosomes[J]. *Signal Transduct Target Ther*, 2024, 9(1):17.
- 13 Li LY, Wang F, Zhu DS, et al. Engineering exosomes and exosome-like nanovesicles for improving tissue targeting and retention[J]. *Fundam Res*, 2025, 5(2):851-867.
- 14 Xing YH, Ren XS, Li DH, et al. Exosome separation and analysis based on microfluidics technology and its clinical applications[J]. *Se Pu*, 2025, 43(5):455-471.
- 15 叶青松, 彭友俭, 骆瑜. 细胞外泌体的分离提取标准化及临床转化进展 [J]. *口腔疾病防治*, 2022, 30(9):609-619.
- 16 Gelibter S, Marostica G, Mandelli A, et al. The impact of storage on extracellular vesicles: a systematic study[J]. *J Extracell Vesicles*, 2022, 11(2):e12162.
- 17 van de Wakker SI, Meijers FM, Sluijter JPG, et al. Extracellular vesicle heterogeneity and its impact for regenerative medicine applications[J]. *Pharmacol Rev*, 2023, 75(5):1043-1061.
- 18 Li CY, Wu XY, Tong JB, et al. Comparative analysis of human mesenchymal stem cells from bone marrow and adipose tissue under xeno-free conditions for cell therapy[J]. *Stem Cell Res Ther*, 2015, 6(1):55.
- 19 Amable PR, Teixeira MVT, Carias RBV, et al. Protein synthesis and secretion in human mesenchymal cells derived from bone marrow, adipose tissue and Wharton's jelly[J]. *Stem Cell Res Ther*, 2014, 5(2):53.
- 20 Kirkham AM, Bailey AJM, Tieu A, et al. MSC-derived extracellular vesicles in preclinical animal models of bone injury: a systematic review and meta-analysis[J]. *Stem Cell Res Ther*, 2022, 18(3):1054-1066.
- 21 Shi LY, Ye XC, Zhou J, et al. Roles of DNA methylation in influencing the functions of dental-derived mesenchymal stem cells[J]. *Oral Dis*, 2024, 30(5):2797-2806.
- 22 Almeria C, Kress S, Weber V, et al. Heterogeneity of mesenchymal stem cell-derived extracellular vesicles is highly impacted by the tissue/cell source and culture conditions[J]. *Cell Biosci*, 2022, 12(1):51.
- 23 Chen XL, Chen A, Woo TL, et al. Investigations into the metabolism of two-dimensional colony and suspended microcarrier cultures of human embryonic stem cells in serum-free media[J]. *Stem Cells Dev*, 2010, 19(11):1781-1792.
- 24 Tapp H, Deepe R, Ingram JA, et al. Adipose-derived mesenchymal stem cells from the sand rat: transforming growth factor beta and 3D co-culture with human disc cells stimulate proteoglycan and collagen type I rich extracellular matrix[J]. *Arthritis Res Ther*, 2008, 10(4):R89.
- 25 Park W, Jang S, Kim TW, et al. Microfluidic-printed microcarrier for in vitro expansion of adherent stem cells in 3D culture platform[J]. *Macromol Biosci*, 2019, 19(8):e1900136.
- 26 Wang X, Ouyang LM, Chen WX, et al. Efficient expansion and delayed senescence of hUC-MSCs by microcarrier-bioreactor system[J]. *Stem Cell Res Ther*, 2023, 14(1):284.
- 27 王晓勋, 张中. 不同微载体细胞培养技术在生物制品领域的应用 [J]. *中国生物制品学杂志*, 2023, 36(12):1515.
- 28 Yan XJ, Zhang K, Yang YP, et al. Dispersible and dissolvable porous microcarrier tablets enable efficient large-scale human mesenchymal stem cell expansion[J]. *Tissue Eng Part C Methods*, 2020, 26(5):263-275.
- 29 Feng L, Liang SJ, Zhou YY, et al. Three-dimensional printing of hydrogel scaffolds with hierarchical structure for scalable stem cell culture[J]. *ACS Biomater Sci Eng*, 2020, 6(5):2995-3004.
- 30 Haraszti RA, Miller R, Stoppato M, et al. Exosomes produced from 3D cultures of MSCs by tangential flow filtration show higher yield and improved activity[J]. *Mol Ther*, 2018, 26(12):2838-2847.
- 31 Yan LT, Wu X. Exosomes produced from 3D cultures of umbilical cord mesenchymal stem cells in a hollow-fiber bioreactor show improved osteochondral regeneration activity[J]. *Cell Biol Toxicol*, 2020, 36(2):165-178.
- 32 Kronstadt SM, Patel DB, Born LJ, et al. Mesenchymal stem cell culture within perfusion bioreactors incorporating 3D-printed scaffolds enables improved extracellular vesicle yield with preserved bioactivity[J]. *Adv Healthc Mater*, 2023, 12(20):e2300584.
- 33 Mi LY, Hu JP, Li N, et al. The mechanism of stem cell aging[J]. *Stem Cell Res Rep*, 2022, 18(4):1281-1293.
- 34 Simonsen JL, Rosada C, Serakinci N, et al. Telomerase expression extends the proliferative life-span and maintains the osteogenic potential of human bone marrow stromal cells[J]. *Nat Biotechnol*, 2002, 20(6):592-596.
- 35 Ahuja D, Sáenz-Robles MT, Pipas JM. SV40 large T antigen targets multiple cellular pathways to elicit cellular transformation[J]. *Oncogene*, 2005, 24(52):7729-7745.
- 36 陈冬雪, 白喜龙, 梁英民. SV40-LT 基因使牙髓干细胞永生化的研究 [J]. *实用口腔医学杂志*, 2022, 38(2):189-193.
- 37 Michael S, Lambert PF, Strati K. The HPV16 oncogenes cause aberrant stem cell mobilization[J]. *Virology*, 2013, 443(2):218-225.
- 38 Yamaguchi N, Horio E, Sonoda J, et al. Immortalization of mesenchymal stem cells for application in regenerative medicine and their potential risks of tumorigenesis[J]. *Int J Mol Sci*, 2024, 25(24):13562.
- 39 Basalova N, Sagaradze G, Arbatskiy M, et al. Secretome of mesenchymal stromal cells prevents myofibroblasts differentiation by transferring fibrosis-associated microRNAs within extracellular vesicles[J]. *Cells*, 2020, 9(5):1272.
- 40 Kraskiewicz H, Paprocka M, Bielawska-Pohl A, et al. Can supernatant from immortalized adipose tissue MSC replace cell therapy? An *in vitro* study in chronic wounds model[J]. *Stem Cell Res Ther*, 2020, 11(1):29.
- 41 Guo SW, Debbi L, Zohar B, et al. Stimulating extracellular vesicles production from engineered tissues by mechanical forces[J]. *Nano Lett*, 2021, 21(6):2497-2504.
- 42 Wang JL, Bonacquisti EE, Brown AD, et al. Boosting the biogenesis and secretion of mesenchymal stem cell-derived exosomes[J]. *Cells*, 2020, 9(3):660.
- 43 Fukuta T, Nishikawa A, Kogure K. Low level electricity increases the secretion of extracellular vesicles from cultured cells[J]. *Biochem Biophys Res*, 2019, 21:100713.
- 44 Gonzalez-King H, García NA, Ontoria-Oviedo I, et al. Hypoxia inducible factor-1 $\alpha$  potentiates jagged 1-mediated angiogenesis by mesenchymal stem cell-derived exosomes[J]. *Stem Cells*, 2017, 35(7):1747-1759.
- 45 Avnet S, Lemma S, Cortini M, et al. The release of inflammatory mediators from acid-stimulated mesenchymal stromal cells favours tumour invasiveness and metastasis in osteosarcoma[J]. *Cancers*

- (Basel), 2021, 13(22):5855.
- 46 李帅, 刘亚婷, 仰大勇. 外泌体分离技术研究进展 [J]. 化学学报, 2025, 83(4):428-438.
- 47 Hua X, Zhu Q, Liu Y, et al. A double tangential flow filtration-based microfluidic device for highly efficient separation and enrichment of exosomes[J]. *Anal Chim Acta*, 2023, 1258:341160.
- 48 Peng J, Li BC, Ma ZY, et al. A microfluidic-based chemiluminescence biosensor for sensitive multiplex detection of exosomal microRNAs based on hybridization chain reaction[J]. *Talanta*, 2025, 281:126838.
- 49 Duan XX, Zhang R, Feng HX, et al. A new subtype of artificial cell-derived vesicles from dental pulp stem cells with the bioequivalence and higher acquisition efficiency compared to extracellular vesicles[J]. *J Extracell Vesicles*, 2024, 13(7):e12473.
- 50 Ye Q, Zhang R. Intracellular vesicles: novel nanovesicles superior to extracellular vesicles in translational medicine and clinical applications[J]. *Nano TransMed*, 2024, 3:100044.
- 51 Hung ME, Leonard JN. Stabilization of exosome-targeting peptides via engineered glycosylation[J]. *J Biol Chem*, 2015, 290(13):8166-8172.
- 52 Yu YH, Li W, Mao L, et al. Genetically engineered exosomes display RVG peptide and selectively enrich a neprilysin variant: a potential formulation for the treatment of Alzheimer's disease[J]. *J Drug Target*, 2021, 29(10):1128-1138.
- 53 Zheng WY, He R, Liang XM, et al. Cell-specific targeting of extracellular vesicles through engineering the glycocalyx[J]. *J Extracell Vesicles*, 2022, 11(12):e12290.
- 54 Du W, Chen C, Liu YY, et al. A combined "eat me/don't eat me" strategy based on exosome for acute liver injury treatment[J]. *Cell Rep Med*, 2025, 6(4):102033.
- 55 Geng TJ, Leung E, Chamley LW, et al. Functionalisation of extracellular vesicles with cyclic-RGDyC potentially for glioblastoma targeted intracellular drug delivery[J]. *Biomater Adv*, 2023, 149:213388.
- 56 Fan YY, Zhou YS, Lu M, et al. Responsive dual-targeting exosome as a drug carrier for combination cancer immunotherapy[J]. *Research*, 2021, 2021:9862876.
- 57 Zhan Q, Yi KK, Qi HZ, et al. Engineering blood exosomes for tumor-targeting efficient gene/chemo combination therapy[J]. *Theranostics*, 2020, 10(17):7889-7905.
- 58 Zhou JL, Wang YH, Zhang LZ, et al. Engineered exosomes-mediated transfer of hsa-miR-320a overcomes chemoresistance in cervical cancer cells via targeting MCL1[J]. *Front Pharmacol*, 2022, 13:883445.
- 59 Huang JH, Yu MY, Yin WJ, et al. Development of a novel RNAi therapy: Engineered miR-31 exosomes promoted the healing of diabetic wounds[J]. *Bioact Mater*, 2021, 6(9):2841-2853.
- 60 Shi Y, Wang S, Liu DW, et al. Exosomal miR-4645-5p from hypoxic bone marrow mesenchymal stem cells facilitates diabetic wound healing by restoring keratinocyte autophagy[J]. *Burns Trauma*, 2024, 12:tkad058.
- 61 Chen W, Yang MC, 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):1700242.
- 62 Hao R, Yu ZT, Du J, et al. A high-throughput nanofluidic device for exosome nanoporation to develop cargo delivery vehicles[J]. *Small*, 2021, 17(35):e2102150.
- 63 Son G, Song J, Park JC, et al. Fusogenic lipid nanoparticles for rapid delivery of large therapeutic molecules to exosomes[J]. *Nat Commun*, 2025, 16(1):4799.
- 64 Görgens A, Corso G, Hagey DW, et al. Identification of storage conditions stabilizing extracellular vesicles preparations[J]. *J Extracell Vesicles*, 2022, 11(6):e12238.
- 65 Wu JY, Li YJ, Hu XB, et al. Preservation of small extracellular vesicles for functional analysis and therapeutic applications: a comparative evaluation of storage conditions[J]. *Drug Deliv*, 2021, 28(1):162-170.
- 66 Théry 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.
- 67 高雪, 慈小燕, 张英驰, 等. 间充质干细胞来源外泌体的分离及贮存方法研究进展 [J]. *药物评价研究*, 2024, 47(5):1146-1152.
- 68 吴颖杰, 耿梦缘, 汪晶, 等. 不同冻干保护剂在外泌体储存中的研究 [J]. *天津医科大学学报*, 2022, 28(4):353-359.
- 69 Ji R, Wang HL, Zheng X, et al. Tetraspanin 4 mediates cholesterol-dependent exosome membrane protection from cryodamage[J]. *Nano Lett*, 2025, 25(27):10722-10732.

(收稿日期: 2025-07-01)

(本文编辑: 陈媛媛)

丁琳, 梁敏莉, 钟嘉琪, 等. 干细胞外泌体临床转化挑战与应对策略 [J/OL]. *中华细胞与干细胞杂志(电子版)*, 2025, 15(5): 301-311.