

外泌体在常见神经退行性疾病中的临床应用

陈炳杏 王超 关秀茹

哈尔滨医科大学附属第一医院检验科, 哈尔滨 150000

通信作者: 关秀茹, Email: gxr0451@sina.com

【摘要】 外泌体是细胞间进行信息通信交流的一种纳米级细胞外囊泡结构, 其携带的多种生物活性分子的成分和含量根据起源细胞和受体细胞而变化, 因此, 外泌体可作为生物标志物进行测定。神经退行性疾病是一种起病隐匿的疾病, 早期筛查和准确诊断无疑是降低其死亡率 and 提高治愈率的可靠保证。外泌体作为近几年的研究热点, 依靠自身所具有的运输能力和内容物对于疾病的诊断治疗存在着巨大潜能, 并且在丰度、稳定性、多样性和获取性方面具有显著优势。该文旨在讨论外泌体作为神经退行性疾病早期诊断的潜在候选者, 从而阐述其应用的全新领域, 以期为临床预测、治疗提供更加丰富的视角。

【关键词】 神经退行性疾病; 生物标志物; 早期诊断; 治疗监测; 外泌体

Clinical application of exosomes in common neurodegenerative diseases

Chen Bingxing, Wang Chao, Guan Xiuru

Department of Clinical Laboratory, the First Affiliated Hospital of Harbin Medical University, Harbin 150000, China

Corresponding author: Guan Xiuru, Email: gxr0451@sina.com

【Abstract】 Exosomes are nanoscale extracellular vesicle structures that communicate and exchange information between cells. They carry a variety of biologically active molecules whose compositions and contents vary according to the origin and recipient cells. Therefore, exosomes can be used as biomarkers. Neurodegenerative diseases are diseases with hidden onset, so early screening and accurate diagnosis is undoubtedly a reliable guarantee to reduce their mortality and increase the cure rate. Exosomes, as a research hotspot in recent years, have great potential for the diagnosis and treatment of diseases given their transport capacity and contents, and have significant advantages in abundance, stability, diversity and accessibility. The purpose of this paper is to discuss exosomes as potential candidates for early diagnosis of neurodegenerative diseases, and thus to elaborate new fields of their application, with a view to providing a richer perspective for clinical prediction and treatment.

【Key words】 Neurodegenerative diseases; Biomarker; Early diagnosis; Treatment monitoring; Exosome

近年来, 神经退行性疾病 (neurodegenerative disease, ND) 的发病率和死亡率呈不断升高的趋势, 它是一类起病隐匿的进展性疾病, 其发病机制复杂, 早期确诊困难, 因此寻找有效的生物标志物在 ND 患者的早期诊断、临床治疗和预后监测的过

程中发挥着至关重要的作用。随着对 ND 研究的不断深入, 发现大脑中所有细胞 (包括神经元、小胶质细胞和星形胶质细胞) 分泌的外泌体, 都在细胞通信中发挥关键作用, 一方面, 外泌体不仅在细胞内短距离传播信号, 而且通过血脑屏障广泛传播到整

DOI: 10.3760/cma.j.cn114452-20231014-00211

收稿日期 2023-10-14 本文编辑 武昱

引用本文: 陈炳杏, 王超, 关秀茹. 外泌体在常见神经退行性疾病中的临床应用[J]. 中华检验医学杂志, 2024, 47(2): 122-128. DOI: 10.3760/cma.j.cn114452-20231014-00211.



中华医学杂志社
Chinese Medical Association Publishing House

版权所有 违者必究



个大脑。另一方面,外泌体进行细胞间通讯时可以携带神经退行性疾病中病理性错误折叠蛋白,从而加快疾病的进展。最后,外泌体的获取相对容易,几乎任何体液中均可获得。有许多公认的经典提取方法,如超离心、聚合物沉淀法、免疫亲和捕获技术。此外,还有很多的新方法正在开发中,其具有更高的预测性、监测性和治疗性,因此外泌体是有潜力的诊断和治疗工具。本文总结了外泌体在ND中的不同作用,为临床医生在诊断疾病和个性化治疗中提供新方向。

一、外泌体概述

1. 外泌体的组成及生物发生和释放:外泌体的主要成分是蛋白质,例如跨膜蛋白白细胞分化抗原9(cluster of differentiation, CD9)、白细胞分化抗原63(cluster of differentiation, CD63)和白细胞分化抗原81(cluster of differentiation, CD81)、细胞骨架蛋白和热休克蛋白如热休克70kDa蛋白(heat shock 70 kDa protein, HSP70);其次还有各种脂类;以及各种类型的RNA,例如微小核糖核酸(abbreviated miRNA, miRNA)、信使RNA(messenger RNA, mRNA)、长链非编码RNA(long non-coding RNA, lncRNA)等。因此外泌体成分的含量和组成可以使用生化分析方法进行研究^[1]。

外泌体的发现是过去几十年细胞生物学中最具突破性的发现之一,其属于异质细胞外囊泡家族的一个亚型。外泌体是最小的一类(30~150 nm)^[2],由质膜和内泌体膜出芽产生,其生产过程涉及质膜的双重内陷和含有腔管小泡(intraluminal vesicle, ILV)的细胞内多囊泡体(multivesicular body, MVB)的形成,在MVB与供体膜融合时将ILV释放到细胞外空间,即被称为外泌体,外泌体可以被几乎所有细胞类型释放,包括神经元、星形胶质细胞和小胶质细胞^[3]。外泌体的生物发生和释放相当依赖原代细胞和靶细胞的生理状态和条件,即不同的外泌体具有不同的蛋白

质、脂质和核酸谱^[4-5]。所以外泌体运输需要专门的途径,包括运输所需的内体分拣复合体(endosomal sorting complex required for transport, ESCRT)依赖的路径和ESCRT非依赖的路径。ESCRT依赖和独立的机制都在外泌体的生物发生中发挥作用^[6]。

2. 外泌体的提取与检测方法:外泌体的常规提取方法通常可分为差速超离心、密度梯度离心、超滤法、沉淀法、免疫亲和捕获等^[7-8](表1)。近几年还出现了微流体芯片及外泌体核酸和蛋白质的综合提取和定量分析方法^[9](表1)。基于试剂盒的外泌体分离方法更方便有效,并且可以获得与超离心方法相似的外泌体回收率和纯度。虽然已经开发出多种外泌体的分离和纯化方法,仍存在一些不能满足临床需求的技术缺陷。大量文献证明不同分离方法的组合可能比单一方法的分离效果更好。例如通过超离心和超滤结合粗提外泌体,再通过免疫亲和和捕获技术,利用磁珠吸附进一步纯化外泌体^[10]。最近Zhang等^[11]基于二氧化钛与外泌体脂质双分子层和外泌体的RNA上的磷酸基团之间的特异性相互作用,开发了一种新的串联富集方法从血清中分离出外泌体的RNA。

蛋白质印迹法、流式细胞术、酶联免疫吸附试验和实时定量逆转录聚合酶链反应是鉴定外泌体成分的常用技术。随着对外泌体研究的不断深入,其在神经退行性疾病中的分离检测技术也逐渐明确。

二、外泌体在中枢神经系统的产生与运输

1. 外泌体与中枢神经细胞:中枢神经系统(central nervous system, CNS)中的神经元和胶质细胞(小胶质细胞、星形胶质细胞和少突胶质细胞)均释放外泌体。其中一些外泌体直接释放到细胞外液和脑脊液中,以影响其他相关细胞的功能。此外,从活化的神经胶质细胞释放的外泌体可以携带促炎分子,如细胞因子,或异常表达的miRNA,一

表1 外泌体提取方法的优缺点

方法	优点	缺点
差速离心法	应用最广泛、提取和分离的金标准、纯度较高	耗时长、成本高、不适合大规模运用
密度梯度离心法	纯度更高、验证外泌体实验的标准	耗时长、产率低
超滤法	高通量、速度快、适合大规模使用	纯度低、颗粒大小不一
免疫亲和捕获法	纯度高、高选择性	回收率低、步骤繁多
沉淀法	高产量、简单易行	纯度最低
尺寸排阻色谱法	高纯度、高重复性	程序复杂、需要稀释黏性样品
微流体技术	高特异性、产率高、所需样本量小、操作简单、节省时间	系统操作复杂、对技术人员要求高

且作用于靶细胞,可以引发大脑可塑性相关基因表达的表现遗传失调,并促进神经炎症和神经变性^[12]。

2. 外泌体可穿透血脑屏障:外泌体可以双向穿越血脑屏障(blood-brain barrier, BBB),且表面成分不发生改变。因此可以使用表面标记物来捕获 CNS 起源的外泌体,识别它们的细胞起源^[13],脑源性外泌体主要通过转运时触发神经胶质细胞活化和神经炎症的突触毒性蛋白,促进神经变性^[14],所以外泌体可以作为 ND 的生物标志物。

三、外泌体与神经退行性疾病

1. 外泌体与阿尔茨海默病(Alzheimer's disease, AD):AD 的特征是细胞外淀粉样 β (A β)斑块的积聚以及微管稳定蛋白 tau 的过度磷酸化,另外还涉及神经原纤维缠结(neurofibrillary tangle, NFT)、营养不良的神经突、突触和神经元的缺失,还有小胶质细胞和星形胶质细胞形态和功能变化的显著胶质增生。AD 的临床症状要比病理改变的发生晚得多,因此发现能够反映 AD 病理改变的早期诊断标志物势在必行。

目前被广泛接受的诊断方法是监测脑脊液中的 A β ₁₋₄₂、总 Tau(T-Tau)和磷酸化 Tau(p-Tau)^[15],但这种方法需要腰椎穿刺,在临床常规实施中较困难,所以要寻找可靠的早期 AD 的血液生物标志物。Sardar 等^[16]发现 A β 可通过外泌体分泌至细胞外,且证明了外泌体可以在细胞间传播毒性 A β 和高磷酸化 Tau 蛋白的能力。Yin 等^[17]认为血液中神经元和星形胶质细胞来源的外泌体是早期 AD 诊断更可靠的外周生物标志物,AD 患者血浆神经元源性外泌体中 p-S396-tau、p-T181-tau 和 A β ₁₋₄₂ 的水平显著增高,这可以预测 AD 的早期发展。另有研究发现,AD 早期的神经炎症和神经退行性变与星形胶

质细胞通过与各种形式的 A β 相互作用激活并转化为 A1 表型有关,由反应性、促炎性或毒性 A1 星形胶质细胞分泌的外泌体似乎参与了病理分子的传播以及白细胞从外周向大脑的募集,使其成为致病因素^[18]。

测量神经元来源的外泌体(neuron-derived exosome, NDE)中突触前蛋白 SNAP-25 的水平也可以研究 AD 的突触病理,Agliardi 等^[19]从 AD 患者和健康对照的血清中分离出一群 NDE,并测量了这些 NDE 中所含 SNAP-25 的浓度。与健康对照(平均 686.42 ng/ml,标准差 204.08 ng/ml)相比,AD 患者 NDE 携带的 SNAP-25 水平(平均 459.05 ng/ml,标准差 146.35 ng/ml)降低($P < 0.001$)。NDE 携带的 SNAP-25 可能是 AD 有效且可获取的生物标志物,此外,Jia 等^[20]进行了一项两阶段的分段研究:第一段临床前 AD 和对照组的研究,第二段一项家族性 AD 研究,不仅证明了 AD 患者早期外泌体 SNAP-25 较对照组降低,而且还证明了早期外泌体 GAP43、神经粒蛋白和突触结合蛋白质 I 同样的降低,这些外泌体生物标志物联合检测可以预测临床前 AD。最后外泌体中存在的大量非编码 RNA 也是 AD 早期诊断的潜在标志物,例如,miRNA-135a、miRNA-193b 等(表 2)。

在神经系统中,外泌体保护神经元免受氧化应激可以协助 A β ₄₂ 的降解。例如 Hao 等^[21]设计生物工程小胶质靶向外泌体,通过增强小胶质溶酶体活性促进 AD 的 A β 清除。这些结果表明外泌体可用于 AD 的治疗。另外,外泌体可以穿过血脑屏障,并具有靶向特定细胞类型的潜力,以递送核酸片段,例如 miRNA 和 siRNA,装载 miRNA-22 修饰间充质干细胞来源的外泌体可以改善 AD 小鼠的认知和行为能力,这与保护神经细胞和抑制神经炎症有

表 2 神经退行性疾病的外泌体的 ncRNA 标志物

疾病	分类	调节	ncRNA	参考文献
阿尔兹海默病	miRNA	上调	miR-15a-5p, miR-18b-5p, let-7b-5p, miR-22-5p, miR135a 等	[29-30]
		下调	miR-15b-3p, miR-193b, miR-16-5p, miR-132-5p 等	[31-32]
	lncRNA	上调	Bace1-AS 等	[33]
帕金森病	miRNA	上调	miR-9-1-5p, miR-153, miR-409-3p, miR-10a-5p, let-7 g-3p, miR-34a-5p, miR-331-5p 等	[34-35]
		下调	miR-15a-5p, miR-24-3p, miR-19b-3p, miR-1, miR-505 等	[36]
	lncRNA	上调	POU3F3 等	[37]
多发性硬化	miRNA	上调	miR-125a, miR-146b, miR-128-3p, miR-191-5p, miR-26a-5p, miR-320a 等	[38-39]
		下调	miR-15a-3p, miR-34c-5p, miR-15b, miR-23a 等	[40]

注:ncRNA 为非编码核酸,miRNA 为微小核糖核酸,lncRNA 为长链非编码 RNA, Bace1-AS 为 β -位点淀粉样蛋白前体蛋白切割酶-1-反义转录物,POU3F3 为 POU 转录因子 3 类同源盒 3

关^[22]。最后外泌体可以提高靶器官的药物浓度,实现个体化治疗。与传统的基因治疗候选载体,如病毒、聚乙烯亚胺纳米颗粒和脂质体相比,外泌体在治疗效果、靶向能力、低免疫反应和安全性方面具有更大的优势^[23]。

2. 外泌体与帕金森症(Parkinson's disease, PD): PD 关键的神经病理学标志是 α -突触核蛋白(α -synuclein, α -syn)的异常聚集形成路易小体(Lewy body, LB),外泌体在 PD 的发病机制中有两个主要作用,作为细胞间 α -syn 传递的重要介质;它们能在细胞间转运 RNA(如 PD 相关的 miRNA)^[24]。

通过分析外泌体中的 α -syn 和非编码 RNA(表 2),可以诊断 PD。 α -syn 被认为是一种低效的 PD 生物标志物,虽然存在于患者血液和脑脊液样本中,但丰度较低,因为外周血细胞可以产生 α -syn,所以血清和血浆 α -syn 的检测也被证明是无效的生物标志物,但 Shi 等^[25]发现 α -syn 可以从脑脊液转运到血液中,其中一些被包装到表达 CNS 特异性神经细胞黏附分子 L1(L1 cell adhesion molecule, L1CAM)的外泌体中,即血浆中 CNS 产生的 EV- α -syn 水平显著较高,其水平与疾病表现的严重程度相关,这表明其可作为 PD 的生物标志物。另外 Zheng 等^[26]通过免疫捕获从血清中分离 L1CAM 阳性外泌体,并测量其 α -syn 水平。与健康对照相比,PD 患者 α -syn 表达水平上调。Ho 等^[27]表明神经源性外泌体分泌的富亮氨酸重复激酶 2(leucine-rich repeat kinase 2, LRRK2)可以作为生物标志物,通过从尿液或脑脊液的临床样品中纯化外泌体来检测 LRRK2。Zhao 等^[28]对血浆神经源性外泌体中 DJ-1 和 a-syn 的水平进行了研究。采用酶联免疫吸附测定法定量检测 PD 患者和对照组血浆和血浆神经源性外泌体中的 DJ-1 和 α -syn。结果显示 PD 患者血浆神经源性外泌体中 DJ-1 和 α -syn 的水平以及血浆神经源性外泌体 DJ-1 与总 DJ-1 的比例显著高于对照组,推测血浆神经源性外泌体中的 DJ-1 可能作为 α -syn 作为 PD 的潜在生物标志物,它们可能共同参与 PD 的发病机制。大量文献发现外泌体非编码 RNA 可以作为潜在早期标志物(表 2),例如,联合测量循环 miR-223-3p、miR-7-1-5p 以及 α -Syn 浓度升高可以区分 PD 患者和健康对照,但仍然需要在大量研究中证实这些研究的敏感度和特异性。

外泌体已被用于携带治疗剂和外源性 siRNA 穿过血脑屏障向全身递送^[41]。例如 Qu 等^[42]证明满

载多巴胺的血液外泌体靶向大脑可以更好地治疗 PD。血清中 α -syn 的神经元外泌体含量的测定可用作其神经元内加工的替代物,因此是监测 PD 患者疾病的缓解治疗的潜在标志物,尤其是在 PD 的早期阶段,将治疗剂掺入外泌体保持了其治疗活性,增加了循环时间,并改善了向大脑的递送效率, Haney 等^[43]开发了一种新的基于外泌体的有效抗氧化剂过氧化氢酶递送系统,用于治疗帕金森病,装载过氧化氢酶的外泌体可有效地积聚在脑神经元和小胶质细胞中,产生神经保护作用。Xue 等^[44]报道了骨髓来源的间充质干细胞外泌体(mesenchymal stem cell, MSC)通过增加细胞间黏附分子 1 表达和减少细胞损伤来增强人脑微血管内皮细胞(human brain microvascular endothelial cell, HBMEC)的血管生成,在 PD 小鼠模型中,MSC 来源的外泌体通过促进 ICAM1 相关的血管生成来促进 PD 的恢复,可能具有治疗 PD 的潜力。

3. 外泌体与多发性硬化(multiple sclerosis, MS): 多发性硬化是一种炎症性疾病,少突胶质细胞丢失、脱髓鞘和受损脑区髓鞘再生失败,自身反应性 CD4+T 细胞(尤其是 Th17 和 Th1 细胞)侵入 CNS,是 MS 的主要免疫病理特征,导致神经轴突变性。MS 有 3 种临床表型:复发-缓解型多发性硬化症(relapsing-remitting multiple sclerosis, RRMS)、继发性进展性多发性硬化症(secondary-progressive multiple sclerosis, SPMS)和原发性进行性多发性硬化(primary-progressive multiple sclerosis, PPMS)^[45]。

多项研究证明,MS 患者外周血和脑脊液中外泌体的表达水平发生改变,并可区分疾病表型且可作为其疾病判断和分期的生物标志物。例如, Galazka 等^[46]证明血清外泌体中高免疫原性的髓磷脂少突胶质细胞糖蛋白(myelin oligodendrocyte glycoprotein, MOG)的存在与疾病活动相关。Ebrahimkhani 等^[47]认为血清外泌体的 miRNA 谱可以通过下一代测序和综合生物信息学准确地识别 MS 患者,并将 RRMS 与进行性疾病区分开来。Karami Fath 等^[48]表明外泌体 miR-326 可能是 MS 患者中被用作诊断和预后的生物标志物。Kimura 等^[49]研究发现 MS 患者循环外泌体抑制了人类 IFN- γ -IL-17A-Foxp3+CD4+T 细胞的诱导。MS 患者的外泌体 miRNA 谱与健康对照不同,而 MS 患者中显著增加的 let-7i 通过靶向胰岛素样生长因子 1 受体和转化生长因子 β 受体 1 抑制 Treg 细胞的诱导。另外,其他的外泌体非编码 RNA 可以作为 MS 的早



期诊断的生物标记物(表 2)。

免疫抑制是目前 MS 治疗的主要目标,以减轻脱髓鞘,EAE 是 MS 最常见的动物模型,将姜黄素负载的胶质母细胞瘤源性外泌体用于 EAE 模型小鼠可延缓和减轻临床症状,此复合物在体内延迟释放,干预免疫紊乱,并且表明外泌体可用于传递抗炎药物。当全身给予骨髓来源的 MSC 时,可以减少免疫细胞浸润和中枢神经系统炎症,以及脱髓鞘过程。使用 IFN- γ 预处理的骨髓来源的 MSC 后,发现 EVE 小鼠症状减轻,这种现象可能是外泌体通过抑制致病性 T 细胞活化和促进 Treg 导致的^[50]。miR-219 是少突胶质细胞祖细胞形成的重要调节因子,用 IFN- γ 处理的树突状细胞释放高水平 miR-219。最后,Zheng 等^[51]开发了一种白藜芦醇负载的 RAW-Exo 配方(RSV&Exo),用于治疗 MS。鼻内给药 RSV&Exo 可显著抑制 MS 小鼠模型中枢神经系统和外周系统的炎症反应,有效改善 MS 的体内临床进展,提供一种潜在治疗策略。

4. 外泌体与其他退行性疾病:肌萎缩侧索硬化症(amyotrophic lateral sclerosis, ALS)是一种进展迅速的神经退行性疾病,以运动神经元丢失、随意肌麻痹等为特征。在 ALS 患者的细胞外泌体中发现了错误折叠的蛋白质,如 mSOD1、FUS、TDP43 和 C9orf72 扩张 DPRS 等神经毒性成分。目前与外泌体相关的一些新兴治疗方法也正在被研究,例如基因组疗法或免疫调节,有可能为推进 ALS 疗法建立更坚实的基础^[52]。Zhu 等^[53]的研究将外泌体与规则成簇的间隔短回文重复序列(clustered regularly interspaced short palindromic repeat, CRISPR)/CRISPR-相关蛋白 9 基因编辑技术结合起来,可以显著提高基因编辑的安全性、精确度和有效性。这些研究和结果为外泌体诊断和治疗神经退行性疾病提供了有力的证据,但还需要深入研究这类疾病的机制,并将这一知识转化为临床中的应用,从而为疾病治疗带来希望。

四、总结与展望

神经退行性疾病作为难以诊断和治疗的疾病,其发病率有着逐年增高的趋势,因此探究 ND 的发病机制,寻找新型的疾病早期诊断标志物是近几年的研究和关注的热点,近年来学术领域对外泌体的结构和功能等的研究有了重大突破,已有多项研究证实外泌体在 ND 病理和治疗过程中发挥关键作用,外泌体自身的优越性使其成为细胞间通讯的重要媒介,在调节正常生命活动和疾病的诊断和治疗

中能发挥独特的生物学功能。作为当前的研究热点,外泌体受到了国内外研究者的广泛关注。然而目前也存在一些问题亟待解决。如利用外泌体内容物作为疾病诊断和预后标志物的检测技术尚不完善;外泌体能否早日应用于临床等。这些问题的合理解决很大程度上取决于对现有外泌体检测技术的优化和改进的结果。外泌体、脂蛋白、病毒和其他细胞外囊泡之间的物理化学和生化特性有相当大的重叠,以及外泌体本身的异质性,使其的研究存在一定变数。所以如何提高外泌体的产量和纯度是当务之急,这一直是限制其转化应用的瓶颈。因此,目前还没有一种特定的外泌体分离技术被认为适用于所有研究。即使是金标准超离心方法也经常受到蛋白质和脂蛋白污染物的影响。理论上适当结合几种方法提取纯化外泌体可以有效改善上述问题,而如何结合以达到最佳效果等还需要进一步研究。

其次,外泌体的分泌机制和融合机制尚不清楚。外泌体异质性对载药效率的影响仍需要深入研究。同时,外泌体装载能力和增强靶向性的方法也需要优化和改进。总之,开展全方位、多领域的研究,分析其生物学功能,为后续的临床试验奠定基础,有助于今后更好地了解机体状态、诊断和治疗疾病。近几年外泌体作为工程性载体大量出现,人们开始对其进行改造修饰以合理运用,且随着时间的推移,其作用机制也逐步阐明,相关法律法规也逐步完善,如何运用外泌体来作为一种药物来填补神经退行性疾病方面的空白甚至运用到更多疾病中,已经是当今社会聚焦的话题。相信随着研究的不断深入,规范、系统、有效、可靠地使用外泌体的时代就在不久的将来。

利益冲突 所有作者声明无利益冲突

参 考 文 献

- [1] Li J, Zhang Y, Dong PY, et al. A comprehensive review on the composition, biogenesis, purification, and multifunctional role of exosome as delivery vehicles for cancer therapy[J]. Biomed Pharmacother, 2023, 165: 115087. DOI: 10.1016/j.biopha.2023.115087.
- [2] Soares Martins T, Trindade D, Vaz M, et al. Diagnostic and therapeutic potential of exosomes in Alzheimer's disease [J]. J Neurochem, 2021, 156(2): 162-181. DOI: 10.1111/jnc.15112.
- [3] Rajendran L, Bali J, Barr MM, et al. Emerging roles of extracellular vesicles in the nervous system[J]. J Neurosci, 2014, 34(46): 15482-15489. DOI: 10.1523/

- JNEUROSCI.3258-14.2014.
- [4] Savina A, Fader CM, Damiani MT, et al. Rab11 promotes docking and fusion of multivesicular bodies in a calcium-dependent manner[J]. *Traffic*, 2005, 6(2): 131-143. DOI: 10.1111/j.1600-0854.2004.00257.x.
- [5] Pegtel DM, Gould SJ. Exosomes[J]. *Annu Rev Biochem*, 2019, 88:487-514. DOI: 10.1146/annurev-biochem-013118-111902.
- [6] Lee YJ, Shin KJ, Jang HJ, et al. GPR143 controls ESCRT-dependent exosome biogenesis and promotes cancer metastasis[J]. *Dev Cell*, 2023, 58(4): 320-334. e8. DOI: 10.1016/j.devcel.2023.01.006.
- [7] Lai JJ, Chau ZL, Chen SY, et al. Exosome processing and characterization approaches for research and technology development[J]. *Adv Sci (Weinh)*, 2022, 9(15):e2103222. DOI: 10.1002/advs.202103222.
- [8] Kimiz-Gebologlu I, Oncel SS. Exosomes: large-scale production, isolation, drug loading efficiency, and biodistribution and uptake[J]. *J Control Release*, 2022, 347:533-543. DOI: 10.1016/j.jconrel.2022.05.027.
- [9] Lin S, Yu Z, Chen D, et al. Progress in microfluidics-based exosome separation and detection technologies for diagnostic applications[J]. *Small*, 2020, 16(9): e1903916. DOI: 10.1002/smll.201903916.
- [10] Mathivanan S, Lim JW, Tauro BJ, et al. Proteomics analysis of A33 immunoaffinity-purified exosomes released from the human colon tumor cell line LIM1215 reveals a tissue-specific protein signature[J]. *Mol Cell Proteomics*, 2010, 9(2):197-208. DOI: 10.1074/mcp.M900152-MCP200.
- [11] Zhang B, Li H, Kong L, et al. Tandem enrichment of serum exosomes and exosomal RNA with titanium dioxide[J]. *J Chromatogr A*, 2023, 1693: 463882. DOI: 10.1016/j.chroma.2023.463882.
- [12] Zhang L, Mao L, Wang H. The neuroprotection effects of exosome in central nervous system injuries: a new target for therapeutic intervention[J]. *Mol Neurobiol*, 2022, 59(12):7152-7169. DOI: 10.1007/s12035-022-03028-6.
- [13] Li C, Qin S, Wen Y, et al. Overcoming the blood-brain barrier: exosomes as theranostic nanocarriers for precision neuroimaging[J]. *J Control Release*, 2022, 349: 902-916. DOI: 10.1016/j.jconrel.2022.08.002.
- [14] Shetgaonkar GG, Marques SM, DCruz C, et al. Exosomes as cell-derivative carriers in the diagnosis and treatment of central nervous system diseases[J]. *Drug Deliv Transl Res*, 2022, 12(5): 1047-1079. DOI: 10.1007/s13346-021-01026-0.
- [15] Counts SE, Ikonovic MD, Mercado N, et al. Biomarkers for the early detection and progression of Alzheimer's disease[J]. *Neurotherapeutics*, 2017, 14(1): 35-53. DOI: 10.1007/s13311-016-0481-z.
- [16] Sardar Sinha M, Ansell-Schultz A, Civitelli L, et al. Alzheimer's disease pathology propagation by exosomes containing toxic amyloid-beta oligomers[J]. *Acta Neuropathol*, 2018, 136(1): 41-56. DOI: 10.1007/s00401-018-1868-1.
- [17] Yin Q, Ji X, Lv R, et al. Targetting exosomes as a new biomarker and therapeutic approach for Alzheimer's disease[J]. *Clin Interv Aging*, 2020, 15: 195-205. DOI: 10.2147/CIA.S240400.
- [18] Upadhya R, Zingg W, Shetty S, Shetty AK. Astrocyte-derived extracellular vesicles: neuroreparative properties and role in the pathogenesis of neurodegenerative disorders. *J Control Release*. 2020;323: 225-239. DOI: 10.1016/j.jconrel.2020.04.017
- [19] Agliardi C, Guerini FR, Zanzottera M, et al. SNAP-25 in serum is carried by exosomes of neuronal origin and is a potential biomarker of Alzheimer's disease[J]. *Mol Neurobiol*, 2019, 56(8): 5792-5798. DOI: 10.1007/s12035-019-1501-x.
- [20] Jia L, Zhu M, Kong C, et al. Blood neuro-exosomal synaptic proteins predict Alzheimer's disease at the asymptomatic stage[J]. *Alzheimers Dement*, 2021, 17(1): 49-60. DOI: 10.1002/alz.12166.
- [21] Hao Y, Su C, Liu X, et al. Bioengineered microglia-targeted exosomes facilitate A β clearance via enhancing activity of microglial lysosome for promoting cognitive recovery in Alzheimer's disease[J]. *Biomater Adv*, 2022, 136: 212770. DOI: 10.1016/j.bioadv.2022.212770.
- [22] Zhai L, Shen H, Sheng Y, et al. ADMSC Exo-MicroRNA-22 improve neurological function and neuroinflammation in mice with Alzheimer's disease[J]. *J Cell Mol Med*, 2021, 25(15):7513-7523. DOI: 10.1111/jcmm.16787.
- [23] Jiang L, Dong H, Cao H, et al. Exosomes in pathogenesis, diagnosis, and treatment of Alzheimer's disease[J]. *Med Sci Monit*, 2019, 25: 3329-3335. DOI: 10.12659/MSM.914027.
- [24] 袁倩, 张斯淼, 肖健豪, 等. 外泌体与神经退行性疾病关系的研究进展[J]. *神经解剖学杂志*, 2019, 35(3):334-338. DOI: 10.16557/j.cnki.1000-7547.2019.03.018.
- [25] Shi M, Liu C, Cook TJ, et al. Plasma exosomal α -synuclein is likely CNS-derived and increased in Parkinson's disease [J]. *Acta Neuropathol*, 2014, 128(5): 639-650. DOI: 10.1007/s00401-014-1314-y.
- [26] Zheng H, Xie Z, Zhang X, et al. Investigation of α -synuclein species in plasma exosomes and the oligomeric and phosphorylated α -synuclein as potential peripheral biomarker of Parkinson's disease[J]. *Neuroscience*, 2021, 469:79-90. DOI: 10.1016/j.neuroscience.2021.06.033.
- [27] Ho DH, Yi S, Seo H, et al. Increased DJ-1 in urine exosome of Korean males with Parkinson's disease[J]. *Biomed Res Int*, 2014, 2014:704678. DOI: 10.1155/2014/704678.
- [28] Zhao ZH, Chen ZT, Zhou RL, et al. Increased DJ-1 and α -synuclein in plasma neural-derived exosomes as potential markers for Parkinson's disease[J]. *Front Aging Neurosci*, 2018, 10:438. DOI: 10.3389/fnagi.2018.00438.
- [29] Liu CG, Song J, Zhang YQ, et al. MicroRNA-193b is a regulator of amyloid precursor protein in the blood and cerebrospinal fluid derived exosomal microRNA-193b is a biomarker of Alzheimer's disease[J]. *Mol Med Rep*, 2014, 10(5):2395-2400. DOI: 10.3892/mmr.2014.2484.
- [30] Liu CG, Meng S, Li Y, et al. MicroRNA-135a in ABCA1-labeled exosome is a serum biomarker candidate for Alzheimer's disease[J]. *Biomed Environ Sci*, 2021, 34(1):19-28. DOI: 10.3967/bes2021.004.
- [31] Yang TT, Liu CG, Gao SC, et al. The serum exosome derived microRNA-135a, -193b, and -384 were potential Alzheimer's disease biomarkers[J]. *Biomed Environ Sci*, 2018, 31(2):87-96. DOI: 10.3967/bes2018.011.
- [32] Lugli G, Cohen AM, Bennett DA, et al. Plasma exosomal mirnas in persons with and without Alzheimer disease: altered expression and prospects for biomarkers[J]. *PLoS One*, 2015, 10(10): e0139233. DOI: 10.1371/journal.



- pone.0139233.
- [33] Wang D, Wang P, Bian X, et al. Elevated plasma levels of exosomal BACE1-AS combined with the volume and thickness of the right entorhinal cortex may serve as a biomarker for the detection of Alzheimer's disease[J]. *Mol Med Rep*, 2020, 22(1): 227-238. DOI: 10.3892/mmr.2020.11118.
- [34] Cao XY, Lu JM, Zhao ZQ, et al. MicroRNA biomarkers of Parkinson's disease in serum exosome-like microvesicles [J]. *Neurosci Lett*, 2017, 644: 94-99. DOI: 10.1016/j.neulet.2017.02.045.
- [35] Yao YF, Qu MW, Li GC, et al. Circulating exosomal miRNAs as diagnostic biomarkers in Parkinson's disease[J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2018, 22(16): 5278-5283. DOI: 10.26355/eurrev_201808_15727.
- [36] Gui Y, Liu H, Zhang L, et al. Altered microRNA profiles in cerebrospinal fluid exosome in Parkinson disease and Alzheimer disease[J]. *Oncotarget*, 2015, 6(35): 37043-37053. DOI: 10.18632/oncotarget.6158.
- [37] Zou J, Guo Y, Wei L, et al. Long Noncoding RNA POU3F3 and α -synuclein in plasma L1CAM exosomes combined with β -glucocerebrosidase activity: potential predictors of Parkinson's disease[J]. *Neurotherapeutics*, 2020, 17(3): 1104-1119. DOI: 10.1007/s13311-020-00842-5.
- [38] Ebrahimkhani S, Vafae F, Young PE, et al. Exosomal microRNA signatures in multiple sclerosis reflect disease status[J]. *Sci Rep*, 2017, 7(1): 14293. DOI: 10.1038/s41598-017-14301-3.
- [39] Selmaj I, Cichalewska M, Namiecinska M, et al. Global exosome transcriptome profiling reveals biomarkers for multiple sclerosis[J]. *Ann Neurol*, 2017, 81(5): 703-717. DOI: 10.1002/ana.24931.
- [40] Manna I, Iaccino E, Dattilo V, et al. Exosome-associated miRNA profile as a prognostic tool for therapy response monitoring in multiple sclerosis patients[J]. *FASEB J*, 2018, 32(8): 4241-4246. DOI: 10.1096/fj.201701533R.
- [41] 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.
- [42] Qu M, Lin Q, Huang L, et al. Dopamine-loaded blood exosomes targeted to brain for better treatment of Parkinson's disease[J]. *J Control Release*, 2018, 287: 156-166. DOI: 10.1016/j.jconrel.2018.08.035.
- [43] Haney MJ, Klyachko NL, Zhao Y, et al. Exosomes as drug delivery vehicles for Parkinson's disease therapy[J]. *J Control Release*, 2015, 207: 18-30. DOI: 10.1016/j.jconrel.2015.03.033.
- [44] Xue C, Li X, Ba L, et al. MSC-derived exosomes can enhance the angiogenesis of human brain MECs and show therapeutic potential in a mouse model of Parkinson's disease[J]. *Aging Dis*, 2021, 12(5): 1211-1222. DOI: 10.14336/AD.2020.1221.
- [45] Martinez B, Peplow PV. MicroRNAs in blood and cerebrospinal fluid as diagnostic biomarkers of multiple sclerosis and to monitor disease progression[J]. *Neural Regen Res*, 2020, 15(4): 606-619. DOI: 10.4103/1673-5374.266905.
- [46] Galazka G, Mycko MP, Selmaj I, et al. Multiple sclerosis: serum-derived exosomes express myelin proteins[J]. *Mult Scler*, 2018, 24(4): 449-458. DOI: 10.1177/1352458517696597.
- [47] Ebrahimkhani S, Vafae F, Young PE, et al. Exosomal microRNA signatures in multiple sclerosis reflect disease status[J]. *Sci Rep*, 2017, 7(1): 14293. DOI: 10.1038/s41598-017-14301-3.
- [48] Karami Fath M, Azami J, Jaafari N, et al. Exosome application in treatment and diagnosis of B-cell disorders: leukemias, multiple sclerosis, and arthritis rheumatoid[J]. *Cell Mol Biol Lett*, 2022, 27(1): 74. DOI: 10.1186/s11658-022-00377-x.
- [49] Kimura K, Hohjoh H, Fukuoka M, et al. Circulating exosomes suppress the induction of regulatory T cells via let-7i in multiple sclerosis[J]. *Nat Commun*, 2018, 9(1): 17. DOI: 10.1038/s41467-017-02406-2.
- [50] Huldani H, Abdalkareem Jasim S, Olegovich Bokov D, et al. Application of extracellular vesicles derived from mesenchymal stem cells as potential therapeutic tools in autoimmune and rheumatic diseases[J]. *Int Immunopharmacol*, 2022, 106: 108634. DOI: 10.1016/j.intimp.2022.108634.
- [51] Zheng X, Sun K, Liu Y, et al. Resveratrol-loaded macrophage exosomes alleviate multiple sclerosis through targeting microglia[J]. *J Control Release*, 2023, 353: 675-684. DOI: 10.1016/j.jconrel.2022.12.026.
- [52] Afonso G, Cavaleiro C, Valero J, et al. Recent advances in extracellular vesicles in amyotrophic lateral sclerosis and emergent perspectives[J]. *Cells*, 2023, 12(13): 1763. DOI: 10.3390/cells12131763.
- [53] Zhu X, Gao M, Yang Y, et al. The CRISPR/Cas9 system delivered by extracellular vesicles[J]. *Pharmaceutics*, 2023, 15(3): 984. DOI: 10.3390/pharmaceutics15030984.