

综述



刘必成, 教授, 主任医师, 现任东南大学医学院院长, 肾脏病研究所所长, 东南大学首席教授(二级), 博士生导师。兼任中华肾脏病学会副主任委员、中国肾脏生理学会副主任委员、华东肾病协会主任委员、国际肾病学会 Fellowship Committee 委员、*Front Physiol* 副主编等学术职务, 国际肾脏病学会会士(Fellow), 国际科学组织协会会士(Vebleo Fellow)。从事肾脏病临床医疗、教学、科研工作 36 年。主要研究方向为肾脏纤维化机制及其临床转化, 主持国家重点研发计划、国家自然科学基金重点、重大国际合作项目等多项课题。在 *Sci Adv*、*J Am Soc Nephrol*、*Kidney Int*、*Cell Death Diff*、*N Engl J Med*、*Lancet*、*Diabetes* 等本领域重要期刊发表中英文论文、综述 520 多篇, 其中 SCI 收录 200 多篇。Elsevier 全球高被引科学家, 主编(译)著作 8 部, 副主编、参编著作 48 部。先后获得国家科技进步二等奖 1 项、教育部自然科学一等奖等省部级成果一等奖 3 项, 教育部科技进步二等奖等省部级成果二等奖 3 项, 其他成果 10 余项, 申请发明专利 11 项, 授权 5 项, 荣获国家卫健委突出贡献中青年专家、江苏省突出医学成就奖和江苏省优秀科技工作者等称号, 享受国务院特殊津贴。

细胞外囊泡在肾脏病治疗中的研究进展

汤涛涛, 吕林莉, 刘必成*

东南大学肾脏病研究所, 东南大学附属中大医院肾脏科, 南京 210009

摘要: 细胞外囊泡(extracellular vesicles, EVs)是细胞分泌的由脂质双分子层包绕形成的膜性囊泡, 其内包含丰富的生物学信息, 参与多种生理和病理过程。近年来, EVs在疾病治疗中也展现出了巨大应用前景, 一方面来源于干细胞的EVs可以直接发挥治疗作用, 另一方面EVs还可以作为一种天然的药物递送载体, 为疾病的治疗提供新的给药策略。本文聚焦EVs在肾脏病治疗中的应用和研究进展。

关键词: 细胞外囊泡; 药物递送; 干细胞; 急性肾损伤; 慢性肾脏病

Research progress of extracellular vesicles in the treatment of renal disease

TANG Tao-Tao, LYU Lin-Li, LIU Bi-Cheng*

Institute of Nephrology, Zhongda Hospital, Southeast University, Nanjing 210009, China

Abstract: Extracellular vesicles (EVs) are lipid bilayer-enclosed structures containing diverse bioactive cargoes that play a major role in intercellular communication in both physiological and pathological conditions. Currently, the field of EV-based therapy has been rapidly growing, and two main therapeutic uses of EVs can be surmised: (i) exploiting stem cell-derived EVs as therapeutic agents; and (ii) employing EVs as natural therapeutic vectors for drug delivery. This review will discuss the recent advances in EV-based therapy in the treatment of renal disease.

Key words: extracellular vesicles; drug delivery; stem cell; acute kidney injury; chronic kidney disease

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 82030024, 81720108007, 81670696), the National Key Research and Development Program of China (No. 2018YFC1314000) and the Medical Science and Technology Support Project of Jiangsu Province, China (No. BL2014080).

*Corresponding author. Tel: +86-25-83262422; E-mail: liubc64@163.com

1 前言

急性肾损伤 (acute kidney injury, AKI) 和慢性肾脏病 (chronic kidney disease, CKD) 是严重威胁人类健康的全球性公共卫生问题^[1, 2]。抗炎治疗是延缓各种急、慢性肾脏病进展的关键策略。目前, 以糖皮质激素为代表的免疫抑制剂是临床治疗的基石, 它们虽具有显著抗炎效应, 但长期大剂量使用会导致全身广泛副作用, 甚至造成患者死亡, 临床应用受到极大限制^[3]。因此, 创新给药方式以提高这些药物的疗效、减轻毒副作用具有十分重要的意义。

细胞外囊泡 (extracellular vesicles, EVs) 是细胞分泌的由脂质双分子层包绕形成的膜性结构, 根据其大小和产生方式的不同, 主要分为外泌体、微囊泡和凋亡小体^[4, 5]。研究表明, 基于 EVs 的治疗主要有两种方式: 一方面, 凭借其自身携带的遗传信息和蛋白质等, 某些特定细胞来源的 EVs 可以直接作为治疗药物参与抗原递呈、免疫调节和组织修复; 另一方面, EVs 如“集装箱”一样的特性使得它们还可以作为一种天然的药物递送载体^[6–8]。2010 年, Sun 等^[9]首次报道了 EVs 递送小分子抗炎药——姜黄素用于脓毒症的治疗。随后, 基于 EVs 的疗法如雨后春笋般迅速发展, 现有研究提示, EVs 可以作为多种类型药物如核酸类药物、小分子药物、蛋白类药物的递送载体^[6–8]。并且, 与传统的人工合成纳米粒等递送载体相比, EVs 具有低免疫原性、无细胞毒性、良好的生物相容性等优点, 为疾病的

治疗提供了新的给药策略^[6–8]。本文主要针对干细胞来源 EVs 和工程化 EVs 在肾脏病治疗中的应用展开综述。

2 干细胞源 EVs 在肾脏病治疗中的应用

干细胞是一类具有自我更新和分化潜能的细胞, 对 AKI 和 CKD 均有良好的治疗效果^[10]。越来越多的证据表明, 干细胞来源的 EVs 同样携带有母细胞的生物活性物质, 具有促增殖、抗凋亡、促血管生成、免疫调节等作用, 参与组织修复与再生^[7, 8, 11] (图 1)。早在 2009 年, Bruno 等^[12]就发现, 来源于间充质干细胞 (mesenchymal stem cell, MSC) 的 EVs (MSC-EVs) 可以促进肾小管上皮细胞增殖, 改善甘油诱导的 AKI, 而 RNase 处理后的 EVs 则丧失了对 AKI 的保护作用, 提示 MSC-EVs 主要是通过其携带的 RNA 成分发挥作用。近期, Cao 等^[13]通过测序发现脐带源性 MSC-EVs 中富含 miR-125b-5p, 可以通过靶向 p53 抑制肾小管上皮细胞凋亡和细胞周期阻滞, 从而促进 AKI 后的肾脏修复, 该研究进一步证实了 RNA 成分在 MSC-EVs 治疗中的重要作用。此外, MSC-EVs 中的生长因子、细胞因子等也引起了人们的关注。例如, 衍生于尿液的 MSC-EVs 富含血管内皮生长因子、转化生长因子- β 1、血管生成素等, 可以促进糖尿病大鼠肾脏中内皮细胞增殖, 减轻足细胞和肾小管上皮细胞凋亡^[14]。来源于脂肪的 MSC-EVs 则可以通过其携带的 IL-10

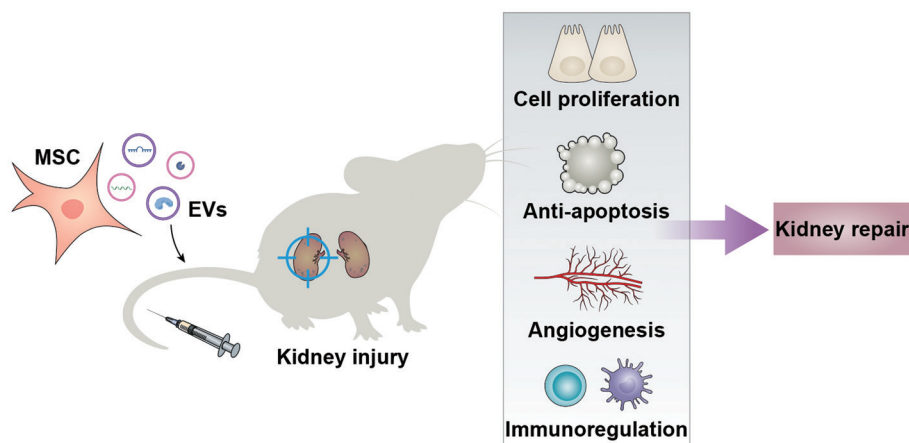


图 1. 来源于间充质干细胞的细胞外囊泡肾脏保护作用机制

Fig. 1. Mechanisms underlying the renoprotective effects of EVs derived from MSCs (MSC-EVs). MSC-EVs carrying various biomolecules, such as mRNA, microRNA, growth factors, cytokines, and hormones, promote cell proliferation, angiogenesis, immune modulation and inhibit apoptosis, thereby favoring the regeneration of injured kidneys. MSCs: mesenchymal stem cells; EVs: extracellular vesicles.

改善代谢综合征和肾动脉狭窄导致的肾脏炎症和纤维化^[15]。

MSC-EVs 不仅在动物模型中展现出了良好效果，而且给肾脏病患者治疗也带来了曙光。一项随机、安慰剂对照的 2/3 期临床试验显示，两次剂量 MSC-EVs 治疗可以安全有效地改善 CKD III-IV 期患者的肾功能，降低血浆中促炎因子 (TNF- α) 水平，并升高抗炎因子 (TGF- β 1、IL-10) 水平^[16]。此外，EVs 治疗还可避免干细胞移植带来的致瘤性、血管栓塞、心律失常、免疫反应等风险^[11]。MSC-EVs 良好的安全性和有效性促使它们更有希望进入临床，造福数以万计的肾脏病患者。

尽管 MSC-EVs 疗法极具前景，但其应用仍面临挑战。首先，EVs 的功能组分易受母细胞状态影响，而来自不同供体的 MSC-EVs 其内容物可能大相径庭。如何保证 MSC-EVs 治疗的稳定性和安全性是亟需解决的难点。其次，MSC-EVs 是否比其母细胞具有更好的治疗作用尚不清楚。有研究显示，MSC-EVs 对新生儿高氧肺损伤的保护作用与 MSC 相当^[17]，而在骨再生^[18]和动脉粥样硬化^[19]方面的疗效则不如 MSC 治疗。因此需要开展更多的比较研究来明确两者的作用差异。

3 工程化 EVs 在肾脏病治疗中的应用

近年来，干细胞源 EVs 的作用机制已被广泛研究，但是工程化 EVs 作为药物递送载体在肾脏病治疗中的应用才初露锋芒。在此部分，我们首先阐述 EVs 的工程化策略，主要包括药物加载和表面修饰，然后介绍工程化 EVs 作为不同类型药物递送载体在肾脏病治疗中的应用。

3.1 EVs 工程化——药物加载

药物加载过程是赋予 EVs 治疗作用的关键，基于目前的技术，可以大致分为外源性加载和内源性加载。

外源性加载是在分离纯化 EVs 后，通过共孵育、化学或物理等方法将药物加载到 EVs 上。通常，疏水性小分子可以通过与 EVs 直接共孵育进行加载，而亲水性小分子则需要其他处理的帮助，如利用皂素松弛囊泡膜结构帮助药物进入 EVs^[20]。电转染、超声、挤压等物理方法则是通过破坏和重建 EVs 脂质双分子层来实现药物的主动加载，其中电转染应用最为广泛。Alvarez-Erviti 等^[21]通过电转染将靶向 BACE1 的 siRNA 加载入树突状细胞来源的 EVs，

成功敲降了脑中 BACE1 mRNA 和蛋白。然而，也有研究提出电转染的加载效率较低，并会导致 siRNA 聚合而混杂在 EVs 中^[22]。近期，Gao 等^[23]通过噬菌体展示技术筛选获得与 EVs 标志蛋白 CD63 特异性结合的多肽 CP05，它可以像桥梁一样将耦联的治疗性药物或靶向多肽通过共孵育连接到 EVs 外膜上，该方法大大简化了加载和功能化 EVs 的过程。

内源性加载是将药物与母细胞共孵育或是通过基因编辑母细胞使其释放的 EVs 含有治疗性物质。例如，将编码 IL-4 基因的质粒转染 BV-2 细胞可以促使其释放含有 IL-4 的 EVs^[24]，但缺点是目标分子的加载不可控。如何保证治疗性分子被特异性装配进 EVs 是亟需解决的难题。有趣的是，Yim 等^[25]开发了一种基于光控的蛋白质加载策略 (EXPLOR)，他们将 CIBN 蛋白与 EVs 标志蛋白 CD9 连接，将 CRY2 蛋白与治疗性蛋白连接，在蓝光的照射下，CIBN 和 CRY2 结合使得治疗性蛋白可以在 EVs 生发过程中进入 EVs 内部，显著提高了目标蛋白的负载率达 1 000 倍以上。

总而言之，这些方法各有利弊，需要根据加载药物类型和治疗要求进行选择。原则上使用的方法不应影响 EVs 的完整性、免疫原性或者药物活性产生影响。

3.2 EVs 工程化——表面修饰

表面修饰也是制备 EVs 药物的重要步骤，可以帮助 EVs 躲避单核吞噬细胞系统的吞噬、延长循环半衰期、增加靶向性等。目前的修饰方法大致可以分为两类：细胞编辑和化学修饰。

基因编辑母细胞可以直接将可编码多肽、抗体和蛋白质等表达在 EVs 上。常用方法是将目标序列插入到 EVs 膜蛋白胞外结构域中，或是直接与 EVs 膜蛋白的一端相连接。其中，EVs 膜上的溶酶体相关膜蛋白 2b (lysosome-associated membrane protein 2b, Lamp2b) 是最常见的修饰靶点，肌肉靶向肽 SKTFNTHPQSTP^[26]和整合素 α_v 靶向肽 iRGD^[27]已被连接在 Lamp2b 蛋白 N 端从而被锚定在 EVs 表面，用于增加其靶向性。但是，连接在 Lamp2b 上的肽段可能会被内体蛋白酶降解，成功表达于 EVs 表面的非常有限^[28]。此外，细胞编辑还可赋予 EVs 其他功能。例如，将水泡性口炎病毒糖蛋白表达在 EVs 表面可以增加受体细胞的摄取^[29]；高表达 EVs 上的 CD47 则可以躲避免疫系统的吞噬^[30]。值得注意的是，基因编辑可能会导致宿主蛋白丢失原有功

能、增加免疫原性。

化学修饰主要借助于材料化学和表面科学的技术将功能分子连接到 EVs 上。其中, 点击化学 (click chemistry) 凭借其简单快速的优势, 已被广泛应用于生物分子的连接。通过该方法可以将荧光基团^[31]、整合素 $\alpha_v\beta_3$ 靶向肽 cRGD^[32]、神经纤毛蛋白 1 靶向肽 RGE^[33] 等连接到 EVs 上。除了共价连接, 反复冻融^[34] 和聚乙二醇 (polyethylene glycol, PEG)^[35] 诱导的 EVs 与脂质体杂化也可以实现 EVs 的功能化。与连接有靶向肽或抗体的脂质体杂化可以使 EVs 也携带上这些功能配体。同时, 杂化后的 EVs 具有更好的稳定性和更长的循环半衰期。

虽然表面修饰赋予了 EVs 更多功能, 但是可能会改变 EVs 膜蛋白结构、破坏 EVs 完整性。并且化学修饰还增加了提纯的难度, 使得 EVs 的生产过程更加复杂。因此, 寻找更加方便、安全、有效的修饰策略是加速 EVs 药物临床转化的关键环节。

3.3 工程化 EVs 作为药物递送载体治疗肾脏疾病

3.3.1 小分子药物

EVs 作为小分子药物递送载体的可行性早在十年前就已被论证。研究人员发现通过 EVs 给药可以改善药物的药代动力学特征, 提高其溶解度、稳定性和生物利用度^[9], 丰富了小分子药物的给药策略。近期, 我们通过将地塞米松与巨噬细胞共孵育, 成功制备了负载药物的微囊泡 (MV-DEX), 并发现来源于巨噬细胞的 MV-DEX 可通过表面的整合素 $\alpha_L\beta_2$ 和 $\alpha_4\beta_1$ 将地塞米松有效递送至炎症损伤的肾脏^[36]。与游离药物相比, MV-DEX 可以更好地改善 LPS 和阿霉素诱导的肾损伤, 降低肾脏炎症反应, 同时还改善了地塞米松对血糖和下丘脑 - 垂体 - 肾上腺轴的影响。有趣的是, MV-DEX 中还携带有糖皮质激素受体, 通过增加靶细胞中受体水平提高地塞米松的抗炎效果。因此, 这种同时负载有药物和受体的 MV-DEX 可能会使激素抵抗型患者受益。

3.3.2 蛋白类药物

蛋白类药物因其较高的生物活性和良好的特异性, 已成为疾病治疗的重要利器。但是, 蛋白类药物仍然面临在体的不稳定性、脱靶效应和免疫原性等问题。Choi 等^[37] 通过上述 EXPLOR 系统将 NF- κ B 抑制因子 I κ B α 加载入 EVs 中, 该 EVs 显著改善了脓毒症小鼠的生存期, 降低循环中促炎因子水平, 并减轻肾脏损伤。此外, 研究人员通过编辑巨噬细胞成功制备了负载 IL-10 的 EVs^[38]。巨噬细胞源

EVs 递送不仅增加了 IL-10 的稳定性, 同时还增加了其靶向损伤肾脏的能力。进一步研究发现, 该 EVs 可以通过抑制 mTOR 信号通路促进肾小管线粒体自噬而维持线粒体功能稳态, 并可诱导间质巨噬细胞向 M2 表型极化, 促进 AKI 后的肾脏修复, 抑制 AKI 慢性进展^[38]。

3.3.3 小核酸药物

在整个治疗领域, EVs 负载小核酸药物受到格外青睐, 这得益于 EVs 自身是天然的核酸载体。研究表明, EVs 可以作为 mRNA、microRNA、siRNA 等多种类型核酸的载体用于治疗肿瘤和神经系统疾病^[21, 30, 39]。其中, siRNA 介导的 RNA 干扰是一种极具潜力的新疗法, 但其在递送、稳定性和免疫原性等方面仍然存在很大挑战。为了实现 siRNA 药物在肾脏病治疗中的应用, 必须开发肾脏细胞特异性递送技术。新近, 我们巧妙地设计了一种可以靶向肾损伤分子 -1 (kidney injury molecule 1, Kim-1) 的递送系统, 通过噬菌体展示技术获得与 Kim-1 特异性结合的多肽 (LTHVWL), 并将其连接在红细胞源 EVs 上, 构建肾脏靶向递送系统 (REV_{LTH})^[40]。研究发现, REV_{LTH} 可有效地靶向至缺血损伤肾脏, 并在 Kim-1⁺ 肾小管中积聚。此外, REV_{LTH} 介导的 siRNA 递送成功敲降了肾小管中靶基因 P65 和 Snai1 的表达, 改善了缺血再灌注和单侧输尿管梗阻诱导的肾脏炎症和纤维化^[40]。

4 EVs 疗法面临的挑战

EVs 疗法凭借自身稳定性高、免疫原性低、可编辑性强等优势有望成为新一代药物递送载体。但是, 其在大规模生产、功能化和应用过程中仍然面临诸多挑战。首先, 目前仍然缺乏符合 GMP 标准的大规模 EVs 生产、提纯方法。虽然一些研究利用中空纤维管系统等细胞培养装置提高了 EVs 的产量^[41], 但是如何在大规模扩增中维持细胞表型和状态仍是一大难点。此外, 目前基于差速离心的提纯方法很难满足产业化发展的需求, 如何快速分离 EVs 但又能保障其纯度和质量, 需要进一步研究。其次, EVs 功能化策略仍然有限, 各方法间缺乏系统比较和评价体系。药物加载效率在很大程度上决定了 EVs 治疗的成败。过度剧烈的加载方法会破坏 EVs 的完整性, 诱导免疫原性, 或导致药物降解。因此, 需要建立针对不同药物的最优加载策略, 在提高加载效率的同时, 尽可能减少对药物或 EVs 的

影响。再者，鉴于肾脏结构的特殊性，肾小球滤过屏障是所有纳米医药应用的巨大挑战。在正常状态下，肾小球滤过屏障只允许粒径 $< 5\sim 7\text{ nm}$ 的分子通过；当肾脏损伤时，随着滤过屏障的破坏，一些大分子可以到达足细胞和肾小管^[42]。虽然 EVs 凭借其天然来源和良好生物相容性能够通过血脑屏障，但其通过肾小球滤过屏障的过程仍然未知。将来需要开发更优的 EVs 标记方法、体内成像技术和超分辨率组织重构技术来动态追踪 EVs 在肾脏的分布。

5 总结

EVs 疗法正在迅速发展和扩大，为新一代药物的研发注入了新的活力。但是，基于 EVs 的肾脏病治疗仍处于早期阶段，临床转化之路任重而道远。未来，医药、纳米技术、材料科学和生物工程等领域需要进行更加深入、广泛的合作，共同开发更为安全、稳定、有效的 EVs 疗法造福广大肾脏病患者。

参考文献

- Ronco C, Bellomo R, Kellum JA. Acute kidney injury. *Lancet* 2019; 394(10212): 1949–1964.
- Zhang L, Wang F, Wang L, Wang W, Liu B, Liu J, Chen M, He Q, Liao Y, Yu X, Chen N, Zhang JE, Hu Z, Liu F, Hong D, Ma L, Liu H, Zhou X, Chen J, Pan L, Chen W, Wang W, Li X, Wang H. Prevalence of chronic kidney diseases in China: a cross-sectional survey. *Lancet* 2012; 379(9818): 815–822.
- Ponticelli C, Locatelli F. Glucocorticoids in the treatment of glomerular diseases: pitfalls and pearls. *Clin J Am Soc Nephrol* 2018; 13 (5): 815–822.
- Kalluri R, LeBleu VS. The biology, function, and biomedical applications of exosomes. *Science* 2020; 367(6478): eaau6977.
- van Niel G, D'Angelo G, Raposo G. Shedding light on the cell biology of extracellular vesicles. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2018; 19(4): 213–228.
- Wiklander OPB, Brennan MÁ, Lötvall J, Breakefield XO, El Andaloussi S. Advances in therapeutic applications of extracellular vesicles. *Sci Transl Med* 2019; 11(492): eaav8521.
- Tang TT, Lv LL, Lan HY, Liu BC. Extracellular vesicles: opportunities and challenges for the treatment of renal diseases. *Front Physiol* 2019; 10: 226.
- Tang TT, Wang B, Lv LL, Liu BC. Extracellular vesicle-based Nanotherapeutics: Emerging frontiers in anti-inflammatory therapy. *Theranostics* 2020; 10(18): 8111–8129.
- Sun D, Zhuang X, Xiang X, Liu Y, Zhang S, Liu C, Barnes S, Grizzle W, Miller D, Zhang HG. A novel nanoparticle drug delivery system: the anti-inflammatory activity of curcumin is enhanced when encapsulated in exosomes. *Mol Ther* 2010; 18(9): 1606–1614.
- Blau HM, Daley GQ. Stem Cells in the treatment of Disease. *N Engl J Med* 2019; 380(18): 1748–1760.
- Riazifar M, Pone EJ, Lötvall J, Zhao W. Stem cell extracellular vesicles: extended messages of regeneration. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2017; 57: 125–154.
- Bruno S, Grange C, Deregibus MC, Calogero RA, Saviozzi S, Collino F, Morando L, Busca A, Falda M, Bussolati B, Tetta C, Camussi G. Mesenchymal stem cell-derived microvesicles protect against acute tubular injury. *J Am Soc Nephrol* 2009; 20(5): 1053–1067.
- Cao JY, Wang B, Tang TT, Wen Y, Li ZL, Feng ST, Wu M, Liu D, Yin D, Ma KL, Tang RN, Wu QL, Lan HY, Lv LL, Liu BC. Exosomal miR-125b-5p deriving from mesenchymal stem cells promotes tubular repair by suppression of p53 in ischemic acute kidney injury. *Theranostics* 2021; 11(11): 5248–5266.
- Jiang ZZ, Liu YM, Niu X, Yin JY, Hu B, Guo SC, Fan Y, Wang Y, Wang NS. Exosomes secreted by human urine-derived stem cells could prevent kidney complications from type I diabetes in rats. *Stem Cell Res Ther* 2016; 7: 24.
- Eirin A, Zhu XY, Puranik AS, Tang H, McGurren KA, van Wijnen AJ, Lerman A, Lerman LO. Mesenchymal stem cell-derived extracellular vesicles attenuate kidney inflammation. *Kidney Int* 2017; 92(1): 114–124.
- Nassar W, El-Ansary M, Sabry D, Mostafa MA, Fayad T, Kotb E, Temraz M, Saad AN, Essa W, Adel H. Umbilical cord mesenchymal stem cells derived extracellular vesicles can safely ameliorate the progression of chronic kidney diseases. *Biomater Res* 2016; 20: 21.
- Ahn SY, Park WS, Kim YE, Sung DK, Sung SI, Ahn JY, Chang YS. Vascular endothelial growth factor mediates the therapeutic efficacy of mesenchymal stem cell-derived extracellular vesicles against neonatal hyperoxic lung injury. *Exp Mol Med* 2018; 50(4): 1–12.
- Xie H, Wang Z, Zhang L, Lei Q, Zhao A, Wang H, Li Q, Cao Y, Jie Zhang W, Chen Z. Extracellular vesicle-functionalized decalcified bone matrix scaffolds with enhanced pro-angiogenic and pro-bone regeneration activities. *Sci Rep* 2017; 7: 45622.
- Takafuji Y, Hori M, Mizuno T, Harada-Shiba M. Humoral factors secreted from adipose tissue-derived mesenchymal stem cells ameliorate atherosclerosis in *Ldlr^{-/-}* mice. *Cardiovasc Res* 2019; 115(6): 1041–1051.
- Fuhrmann G, Serio A, Mazo M, Nair R, Stevens MM. Active

- loading into extracellular vesicles significantly improves the cellular uptake and photodynamic effect of porphyrins. *J Control Release* 2015; 205: 35–44.
- 21 Alvarez-Erviti L, Seow Y, Yin H, Betts C, Lakhali S, Wood MJ. Delivery of siRNA to the mouse brain by systemic injection of targeted exosomes. *Nat Biotechnol* 2011; 29(4): 341–345.
 - 22 Kooijmans SAA, Stremersch S, Braeckmans K, de Smedt SC, Hendrix A, Wood MJA, Schiffelers RM, Raemdonck K, Vader P. Electroporation-induced siRNA precipitation obscures the efficiency of siRNA loading into extracellular vesicles. *J Control Release* 2013; 172(1): 229–238.
 - 23 Gao X, Ran N, Dong X, Zuo B, Yang R, Zhou Q, Moulton HM, Seow Y, Yin H. Anchor peptide captures, targets, and loads exosomes of diverse origins for diagnostics and therapy. *Sci Transl Med* 2018; 10(444): eaat0195.
 - 24 Casella G, Colombo F, Finardi A, Descamps H, Ill-Raga G, Spinelli A, Podini P, Bastoni M, Martino G, Muzio L, Furlan R. Extracellular vesicles containing IL-4 modulate neuroinflammation in a mouse model of multiple sclerosis. *Mol Ther* 2018; 26(9): 2107–2118.
 - 25 Yim N, Ryu SW, Choi K, Lee KR, Lee S, Choi H, Kim J, Shaker MR, Sun W, Park JH, Kim D, Heo WD, Choi C. Exosome engineering for efficient intracellular delivery of soluble proteins using optically reversible protein-protein interaction module. *Nat Commun* 2016; 7: 12277.
 - 26 Wang B, Zhang A, Wang H, Klein JD, Tan L, Wang ZM, Du J, Naqvi N, Liu BC, Wang XH. miR-26a limits muscle wasting and cardiac fibrosis through exosome-mediated microRNA transfer in chronic kidney disease. *Theranostics* 2019; 9(7): 1864–1877.
 - 27 Tian Y, Li S, Song J, Ji T, Zhu M, Anderson GJ, Wei J, Nie G. A doxorubicin delivery platform using engineered natural membrane vesicle exosomes for targeted tumor therapy. *Biomaterials* 2014; 35(7): 2383–2390.
 - 28 Hung ME, Leonard JN. Stabilization of exosome-targeting peptides via engineered glycosylation. *J Biol Chem* 2015; 290(13): 8166–8172.
 - 29 Yang Y, Hong Y, Nam GH, Chung JH, Koh E, Kim IS. Virus-mimetic fusogenic exosomes for direct delivery of integral membrane proteins to target cell membranes. *Adv Mater* 2017; 29: 1605604.
 - 30 Kamekar S, LeBleu VS, Sugimoto H, Yang S, Ruivo CF, Melo SA, Lee JJ, Kalluri R. Exosomes facilitate therapeutic targeting of oncogenic KRAS in pancreatic cancer. *Nature* 2017; 546(7659): 498–503.
 - 31 Smyth T, Petrova K, Payton NM, Persaud I, Redzic JS, Graner MW, Smith-Jones P, Anchordoquy TJ. Surface functionalization of exosomes using click chemistry. *Bioconjug Chem* 2014; 25(10): 1777–1784.
 - 32 Tian T, Zhang HX, He CP, Fan S, Zhu YL, Qi C, Huang NP, Xiao ZD, Lu ZH, Tannous BA, Gao J. Surface functionalized exosomes as targeted drug delivery vehicles for cerebral ischemia therapy. *Biomaterials* 2018; 150: 137–149.
 - 33 Jia G, Han Y, An Y, Ding Y, He C, Wang X, Tang Q. NRP-1 targeted and cargo-loaded exosomes facilitate simultaneous imaging and therapy of glioma *in vitro* and *in vivo*. *Biomaterials* 2018; 178: 302–316.
 - 34 Sato YT, Umezaki K, Sawada S, Mukai SA, Sasaki Y, Harada N, Shiku H, Akiyoshi K. Engineering hybrid exosomes by membrane fusion with liposomes. *Sci Rep* 2016; 6: 21933.
 - 35 Piffoux M, Silva AKA, Wilhelm C, Gazeau F, Taresté D. Modification of extracellular vesicles by fusion with liposomes for the design of personalized biogenic drug delivery systems. *ACS Nano* 2018; 12(7): 6830–6842.
 - 36 Tang TT, Lv LL, Wang B, Cao JY, Feng Y, Li ZL, Wu M, Wang FM, Wen Y, Zhou LT, Ni HF, Chen PS, Gu N, Crowley SD, Liu BC. Employing macrophage-derived microvesicle for kidney-targeted delivery of dexamethasone: an efficient therapeutic strategy against renal inflammation and fibrosis. *Theranostics* 2019; 9(16): 4740–4755.
 - 37 Choi H, Kim Y, Mirzaaghasi A, Heo J, Kim YN, Shin JH, Kim S, Kim NH, Cho ES, In Yook J, Yoo TH, Song E, Kim P, Shin EC, Chung K, Choi K, Choi C. Exosome-based delivery of super-repressor I κ B α relieves sepsis-associated organ damage and mortality. *Sci Adv* 2020; 6(15): eaaz6980.
 - 38 Tang TT, Wang B, Wu M, Li ZL, Feng Y, Cao JY, Yin D, Liu H, Tang RN, Crowley SD, Lv LL, Liu BC. Extracellular vesicle-encapsulated IL-10 as novel nanotherapeutics against ischemic AKI. *Sci Adv* 2020; 6(33): eaaz0748.
 - 39 Usman WM, Pham TC, Kwok YY, Vu LT, Ma V, Peng B, Chan YS, Wei L, Chin SM, Azad A, He AB, Leung AYH, Yang M, Shyh-Chang N, Cho WC, Shi J, Le MTN. Efficient RNA drug delivery using red blood cell extracellular vesicles. *Nat Commun* 2018; 9(1): 2359.
 - 40 Tang TT, Wang B, Li ZL, Wen Y, Feng ST, Wu M, Liu D, Cao JY, Yin Q, Yin D, Fu YQ, Gao YM, Ding ZY, Qian JY, Wu QL, Lv LL, Liu BC. Kim-1 targeted extracellular vesicles: a new therapeutic platform for RNAi to treat AKI. *J Am Soc Nephrol* 2021; 32(10): 2467–2483.
 - 41 Cao J, Wang B, Tang T, Lv L, Ding Z, Li Z, Hu R, Wei Q, Shen A, Fu Y, Liu B. Three-dimensional culture of MSCs produces exosomes with improved yield and enhanced therapeutic efficacy for cisplatin-induced acute kidney injury. *Stem Cell Res Ther* 2020; 11(1): 206.
 - 42 Kamaly N, He JC, Ausiello DA, Farokhzad OC. Nanomedicines for renal disease: current status and future applications. *Nat Rev Nephrol* 2016; 12(12): 738–753.