

DOI: 10.20135/j.issn.1006-8147.2024.03.0212

论著

功能化外泌体对实验性自身免疫性脑脊髓炎小鼠治疗的研究

陈傲, 邱帅, 李悦, 尹海芳

(天津医科大学基础医学院细胞生物学系, 天津 300070)

摘要 目的:探究负载髓鞘少突胶质细胞糖蛋白(MOG)的293F细胞来源的外泌体(EXO)对实验性自身免疫性脑脊髓炎(EAE)小鼠的治疗效果。方法:利用Western印迹、透射电子显微镜以及Nanosight对超速离心分离的293F细胞上清EXO进行表征;利用流式细胞术和共聚焦显微镜检测细胞摄取EXO的生物学功能;利用EXO特异性锚定肽EXP将MOG抗原肽修饰于EXO表面,流式细胞术检测EXO与MOG抗原肽的结合效率(EXO_{MOG});活体成像检测 EXO_{MOG} 的体内分布;利用小鼠的临床评分、体重变化以及收样时小鼠脾细胞中调节性T细胞变化和脊髓染色,评估 EXO_{MOG} 对EAE小鼠的治疗效果;利用组织形态学染色检测 EXO_{MOG} 治疗对各组小鼠不良反应。结果:超速离心可成功分离EXO,且分离的EXO具有被细胞摄取的生物学功能;EXP外泌体锚定肽介导MOG抗原肽高效负载于EXO表面,且不影响EXO的体内分布;在EAE小鼠上测试结果显示:与未治疗组和MOG组相比, EXO_{MOG} 组小鼠治疗后第24天的体重显著增加($P<0.05$),行为学评分显著降低($P<0.05$),且治疗后小鼠脾脏中 $CD4^+CD25^+$ Treg细胞显著增高($P<0.05$);病理染色结果表明: EXO_{MOG} 组小鼠的各组织器官未见明显病理学改变。结论: EXO_{MOG} 能够有效缓解小鼠EAE疾病进展且未检测到相关不良反应。

关键词 多发性硬化;实验性自身免疫性脑脊髓炎;外泌体;293F悬浮细胞;髓鞘少突胶质细胞糖蛋白

中图分类号 Q291

文献标志码 A

文章编号 1006-8147(2024)03-0212-06

Study of functionalized exosomes for treating experimental autoimmune encephalomyelitis in mice

CHEN Ao, QIU Shuai, LI Yue, YIN Haifang

(Department of Cell Biology, School of Basic Medical Sciences, Tianjin Medical University, Tianjin 300070, China)

Abstract Objective: To explore the therapeutic effect of exosomes (EXO) derived from 293F cells loaded with myelin oligodendrocyte glycoprotein (MOG) on experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) mice. **Methods:** Characterization of EXO from the culture supernatant of 293F cells separated by ultracentrifugation using Western blotting, transmission electron microscopy, and nano-sight. Flow cytometry and confocal microscopy were used to detect the biological function of cells taking up EXO. MOG antigen peptides were loaded on the surface of EXO via exosomal anchor peptide-EXP. Flow cytometry was used to detect the binding efficiency of EXO and MOG antigen peptide (EXO_{MOG}) and small animal imaging was applied to examine the distribution of EXO_{MOG} . The therapeutic effect of EXO_{MOG} on EAE mice was evaluated by the changes of clinical score, weight, regulatory T cells in spleen cells and spinal cord staining at the time of sample collection. The toxic of EXO_{MOG} on mice in each group were detected by tissue morphology staining. **Results:** EXO could be successfully separated by ultracentrifugation, and the EXO had the biological function of being taken up by cells. The anchor peptide of EXP exosomes mediated the efficient loading of MOG antigen peptides on the surface of EXO without altering the *in vivo* distribution of EXO. The test results on EAE mice showed that compared to the untreated group and MOG alone group, EXO_{MOG} treatment significantly increased the weight on the 24th day after induction ($P<0.05$). Behavioral scores significantly declined in EAE mice treated with EXO_{MOG} compared with untreated controls ($P<0.05$). The immuno-tolerogenic $CD4^+CD25^+$ Treg cells in the spleen of mice significantly increased after treatment ($P<0.05$). The pathological examination revealed that there were no significant pathological changes in the tissues and organs of the EXO_{MOG} group mice. **Conclusion:** EXO_{MOG} are able to effectively prevent the progression of EAE disease in mice without any drug-associated toxicity.

Key words multiple sclerosis; experimental autoimmune encephalomyelitis; exosomes; 293F suspension cells; myelin oligodendrocyte glycoprotein

多发性硬化(multiple sclerosis, MS)是一种以炎症细胞浸润为特点的中枢神经系统自身免疫性疾病。炎症细胞浸润会导致神经元变性、轴突损伤和

髓鞘脱失,从而引起神经系统综合征和身体残疾^[1]。目前,自身免疫性疾病的治疗主要通过诱导全身免疫抑制来缓解疾病进展,包括通过诱导调节性T细胞(regulatory T cells, Tregs)升高的手段来降低免疫反应^[2]。难以在体内诱导抗原特异性Tregs的产生,是基于Tregs临床治疗所面临的最大困境之一^[3-4]。近

基金项目 中央支持地方高校发展基金(116003/XK010302)

作者简介 陈傲(1997-),男,硕士在读,研究方向:靶向治疗;通信作者:尹海芳, E-mail: haifangyin@tmu.edu.cn。

年来,利用自身抗原来诱导机体产生免疫耐受的疗法受到广泛关注,通过将自身抗原负载到人工合成纳米颗粒上来诱导免疫耐受,对MS具有一定的治疗效果^[5]。然而,纳米颗粒虽然能增加自身抗原的稳定性,但是其自身存在免疫原性等问题。

外泌体(exosome,EXO)作为细胞分泌的天然生物纳米囊泡^[6],富含多种蛋白质和核酸分子,是细胞间信息传递的信使。同时,EXO具有生物相容性高、免疫原性低、可进行功能化修饰等特性,是一种理想的生物纳米递送载体^[7-8]。未修饰的EXO通过静脉系统给药时,作用的主要靶器官为肝脏,而肝脏是引起外周免疫耐受的主要免疫器官之一。本研究拟利用EXO被动靶向肝脏的特性,在MS小鼠模型上负载自身抗原肽以诱导抗原特异性Tregs,抑制炎症细胞浸润,从而达到缓解MS的目的。在前期的研究中,本课题组通过噬菌体展示技术和高通量测序,获得可与EXO表面标志物CD63蛋白特异性结合的锚定肽CP05^[9]。并利用CP05的变体短肽库进行筛选和结构预测,获得一种与EXO结合能力更强的锚定短肽EXP(ZL20191084784.X)。因此,本研究利用EXO特异锚定肽EXP将髓鞘少突胶质细胞糖蛋白(MOG)负载到293F细胞来源的EXO表面,以获得新型生物纳米药物EXO_{MOG},将其应用在实验性自身免疫性脑脊髓炎(EAE)小鼠模型上^[10],系统评估EXO_{MOG}对EAE的缓解效果^[11]和安全性,以期对MS治疗提供新思路。

1 材料与方法

1.1 材料 293F细胞、RAW264.7均购买于中国典型培养物保藏中心。FreeStyle™293表达培养基(美国Gibco公司),DiR荧光染料(美国ThermoFisher公司),TSG101单克隆抗体(sc-7964,美国Santa Cruz公司),CD81单克隆抗体(sc-66029,美国Santa Cruz公司),Calnexin(C5C9)Rabbit mAb抗体(美国CST公司),HRP标记的羊抗兔抗体(中国联科生物),HRP标记的羊抗鼠抗体(中国联科生物),Complete Freund's Adjuvant(美国Sigma公司),Mycobacterium Tuberculosis(美国BD公司),Pertussis Toxin(美国List biological laboratories),MOG₃₅₋₅₅、FITC-MOG-EXP(中国强耀生物),改良苏木素伊红(HE)染色试剂盒、伊红染色液(醇溶,0.5%)(中国索莱宝),Luxol Fast Blue髓染色液(中国索莱宝),流式抗体CD4-PE、CD25-PE-Cy7(美国Invitrogen)。

所有实验均使用6~8周C57BL/6野生型小鼠。在温度受控的特定无病原体条件下饲养小鼠。实验已通过天津医科大学动物伦理委员会审批(许可证

号:SYXK 2019-0004)。

1.2 方法

1.2.1 293F细胞培养及EXO分离和收集 将293F细胞在FreeStyle293表达培养基中培养,存放在容量为1L的无菌锥形瓶中,并保存在37℃的振荡培养箱中,在含有5%CO₂的潮湿空气中以120 r/min的速度搅拌。当培养物密度达到约 2×10^6 /mL时,收取上清(2~3次/d)^[12]。将上清进行梯度离心(2 000×g离心20 min,10 000×g离心30 min),去除细胞碎片,用0.22 μm滤器除去大囊泡;再将滤液100 000×g离心70 min,弃去上清,用干净的100 μL DPBS重悬离心管底部,回收EXO,-80℃冰箱保存备用。

1.2.2 醋酸铀染色及透射电镜观察 将20 μL EXO悬液加入等量的4%多聚甲醛室温固定20 min;将铜网吸附在EXO悬液上放置于室温25 min,之后将铜网吸附有EXO的一侧转移到100 μL纯净的DPBS和超纯水液滴上,各洗2次,每次5 min;将铜网转移到100 μL 1%戊二醛5 min;100 μL超纯水液滴洗8次,每次2 min;将铜网转移到100 μL草酸铀溶液负染5 min;将铜网转移到50 μL甲基纤维素-乙酸双氧铀溶液,置于冰上染色7 min;吸去多余的溶液,置于滤纸上晾干铜网,透射电镜观察。

1.2.3 Western印迹检测EXO标志性蛋白的表达 取2 mL密度为 2×10^6 /mL的293F细胞上清,经过离心、洗涤、离心得到293F细胞,加入细胞裂解液,提取293F细胞总蛋白,得到Cell lysate。用Nanodrop测定EXO重悬液和Cell lysate浓度,蛋白质为30 μg,进行SDS-PAGE电泳、转膜,分别孵育一抗兔源Calnexin单克隆抗体(使用脱脂牛奶1:10 000稀释)、一抗鼠源TSG101单克隆抗体(使用脱脂牛奶1:200稀释)和一抗鼠源CD81单克隆抗体(使用脱脂牛奶1:200稀释),4℃孵育过夜。次日,用5%的脱脂牛奶洗涤PVDF膜3次,每次洗涤10 min;加入二抗(鼠二抗和兔二抗均使用脱脂牛奶1:5 000稀释),4℃摇床孵育90 min;PBST洗涤3次,每次10 min;最后滴上发光液,压片曝光。

1.2.4 Nanosight检测EXO粒径 对超速离心得到的EXO悬液稀释2 000倍,稀释至1 mL 1×DPBS中。将稀释后的样品转移到1 mL注射器中,按照标准步骤进行上样检测,设定Camera level为13,温度为25℃,每个样品检测3次,使Nanosight的粒径检出浓度在 $1 \times 10^8 \sim 1 \times 10^9$ 范围内,在此稀释浓度下检测并分析EXO样品的粒径。

1.2.5 RAW264.7细胞摄取DiR标记的EXO 使用DiR标记EXO,将RAW264.7细胞消化、洗涤、计

数,按 1×10^5 个细胞/孔铺到 24 孔板爬片中,贴壁生长 24 h。再将 30 μg DiR 标记的 EXO 加入其中,轻轻混匀,继续培养 24 h。一半细胞弃去上清使用 DPBS 清洗 3 次,4% PFA 固定后抠出爬片,倒扣在在含有 DAPI 的荧光封片剂上,避光风干 8 h 后用激光共聚焦显微镜观察细胞中的 DiR 荧光;另一半细胞消化后,流式检测 DiR 荧光。

1.2.6 流式细胞术检测 MOG-EXP 短肽与 EXO 的结合效率 使用 DiR 标记 EXO,将 10 μg DiR 标记 EXO 和 200 ng 短肽加入到 200 μL 1 \times DPBS 中,室温旋转孵育 4 h,100 kD 超滤管 4 000 $\times g$ 离心 10 min 去除游离的短肽。流式细胞仪检测 EXO 上 FAM 的荧光。

1.2.7 小动物成像检测 EXO 的体内组织分布 将 DiR 标记的 EXO 和 EXO_{MOG} 尾静脉注射到 C57BL/6 健康小鼠($n=3$),2 h 后,取小鼠组织和器官,小动物成像系统观察 EXO 在组织中的分布情况。

1.2.8 EAE 小鼠模型的构建及治疗 C57BL/6 小鼠共 16 只,分为野生型组、未治疗组、MOG 组、EXO_{MOG} 组,每组 4 只。制备 CFA 工作液、MOG₃₅₋₅₅ 储存液、抗原-佐剂乳化液、PT 储存液、PT 工作液^[13]。未治疗组、MOG 组和 EXO_{MOG} 组小鼠麻醉后背部备皮,用 1 mL 注射器从三通管中吸取 MOG₃₅₋₅₅-CFA 乳剂(1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$),排尽气泡,分别在鼠颈膨大处、腰膨大处皮下各注射 100 μL 。小鼠右侧腹腔注射 PT 工作液(1 ng/ μL) 250 μL ;48 h 后,腹腔注射 PT 工作液 250 μL 。免疫后第 13 天开始,给予 MOG 组小鼠单次尾静脉注射 100 μg MOG/只;EXO_{MOG} 组单次尾静脉注射 7 μg EXO_{MOG}/只;未治疗组单次尾静脉注射与实验组等体积的 DPBS^[5]。常规饲养小鼠观察一般情况,按时记录体重和行为学评分。24 d 后处死小鼠,称取脾重,取组织进行石蜡包埋。

1.2.9 HE 染色和 Luxol Fast Blue(LFB)染色 使用自动石蜡切片机将不同处理组小鼠组织块切成厚度约 4 μm 石蜡片,并黏附于新的载玻片上,将载玻片置于 65 $^{\circ}\text{C}$ 烘箱中烘烤 1.5 h,连续切片一半使用二甲苯进行脱蜡 10 min,按体积分数从高到低进行酒精梯度水化,每个梯度浸泡 3 min;使用苏木素染液对切片进行染色 8 min,1%盐酸乙醇溶液分化 5 s,1%氨水反蓝 2 min;再用伊红染液对组织细胞质进行染色 2 min,使用蒸馏水洗去除未结合的伊红染液;按体积分数从低到高依次进行酒精梯度脱水,二甲苯浸泡 1 min 继续脱水,使其透明;中性树胶封片。另一半脱蜡至 95%乙醇;加入 Luxol Fast Blue 染色液,室温过夜;加入 95%乙醇洗去多余染色液;蒸

馏水冲洗;加入 Luxol 分化液分色 15 s;加入 70%乙醇分色 30 s;加入焦油紫染色液复染 30~40 s,水洗;用 95%、100%乙醇脱水,二甲苯透明,中性树胶封固。风干后置于正置显微镜下观察、拍照。

1.2.10 分离小鼠脾脏淋巴细胞 将脾脏置于 40 μm 的滤网,加入 3 mL DPBS 研磨;细胞悬液 400 $\times g$ 离心 5 min;加入 3 mL ACK,静置 3 min;加入 3 mL DPBS 终止,400 $\times g$ 离心 5 min;弃上清,加 1 mL DPBS 重悬,400 $\times g$ 离心 5 min;取适量细胞于 1.5 mL EP 管,加入 100 μL DPBS,0.2 μL 抗体(抗体终浓度 0.2 $\mu\text{g}/100 \mu\text{L}$);混匀,冰上避光孵育 40 min;加入 500 μL DPBS 400 $\times g$ 离心 5 min;200 μL DPBS 重悬,混匀后流式检测。

1.3 统计学处理 使用 Photoshop、Adobe illustrator、GraphPad 软件作图,使用 FlowJo 软件对流式细胞术结果进行分析获得图形及数据,使用 SPSS16.0 进行统计分析。符合正态分布的数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间均数比较采用独立样本 t 检验, $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

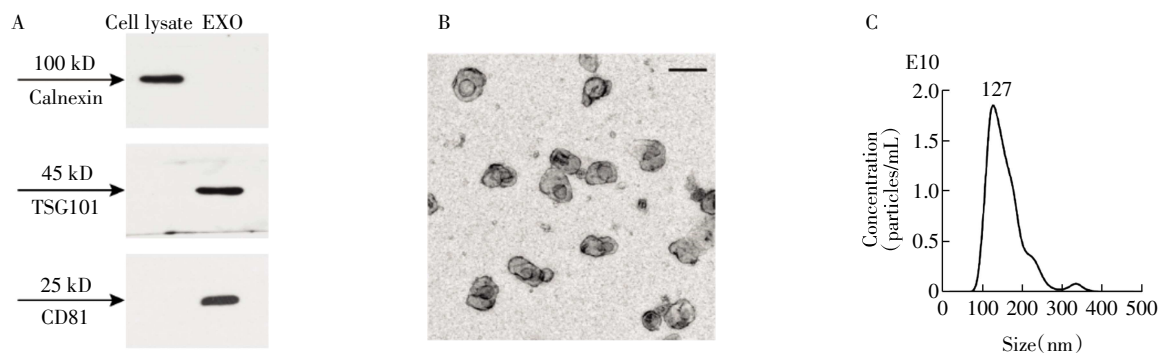
2 结果

2.1 293F 细胞来源 EXO 表征 Western 印迹显示:TSG101 和 CD81 表达于 293F 细胞来源的 EXO,未检测到 Calnexin 蛋白表达(图 1A)。利用透射电镜检测 EXO 形态结构,观察到 EXO 呈典型的碗状双层膜结构,结构完整、大小均匀(图 1B)。利用纳米粒度分析仪检测 EXO 的粒径范围和浓度,结果显示:EXO 的平均粒径在 127 nm,颗粒大小在正常的 EXO 粒径范围内(50~200 nm,图 1C)。

2.2 细胞摄取 EXO 实验验证 利用膜染料 DiR 标记 EXO,流式细胞结果显示:DiR 标记 EXO 的效率为 95%(图 2A)。将 DiR 标记的 EXO 与 RAW264.7 细胞共孵育,利用流式分析检测细胞摄取,结果显示:EXO 可被 RAW264.7 细胞高效摄取,摄取效率约为 99%(图 2B)。通过共聚焦显微镜观察,发现大多数 EXO 主要定位于细胞质中(图 2C)。

2.3 EXO 与 MOG 的结合效率及 EXO_{MOG} 组织分布 利用流式细胞仪检测 MOG 与 EXO 的结合效率,结果显示:MOG-EXP 与 EXO 结合效率为 99.1%(图 3A)。尾静脉注射 DiR 标记的 EXO 后,小动物成像检测不同组织中荧光信号,EXO 与 EXO_{MOG} 主要集中在肝脏,其次为脾,二者组织分布未有明显区别(图 3B)。

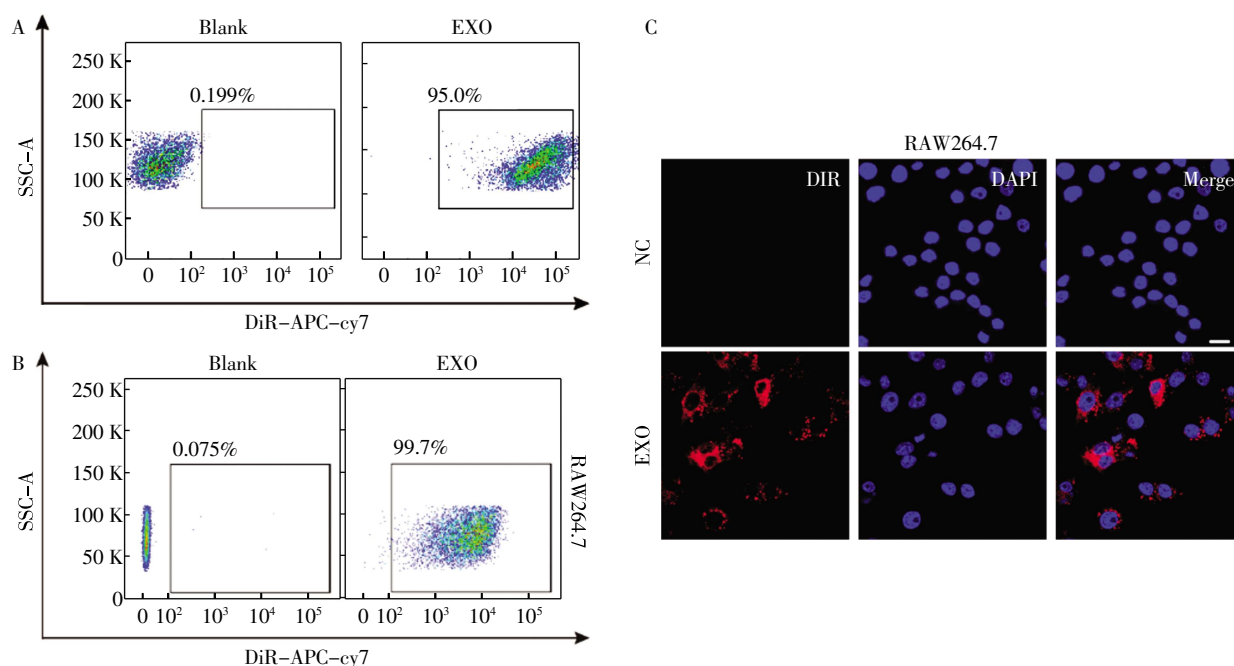
2.4 EXO_{MOG} 有效抑制 EAE 小鼠炎症 建模后第 13 天,实验小鼠临床评分达到 2 分并且均表现出临床症状,包括步态摇摆等。第 13 天通过尾静脉单次



注:A:Western 印迹检测 EXO 表面特征蛋白表达;B:透射电镜检测 EXO 的形态特征,标尺 200 nm; C:Nanosight 检测 EXO 粒径的范围和浓度

图1 超速离心分离的 293F 细胞来源 EXO 表征

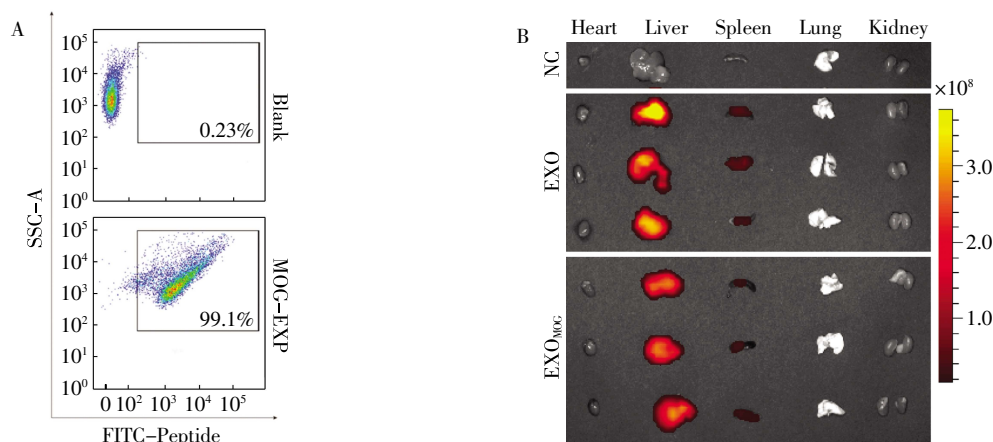
Fig.1 Characterization of EXO derived from 293F cell isolated by ultracentrifugation



注:A:流式细胞术检测 DiR 标记的效率;B:流式细胞术检测 RAW264.7 细胞对的 EXO 摄取;C:共聚焦显微镜观察 RAW264.7 细胞对的 EXO 摄取,标尺 10 μ m

图2 EXO 细胞摄取实验

Fig.2 Cellular uptake of EXO



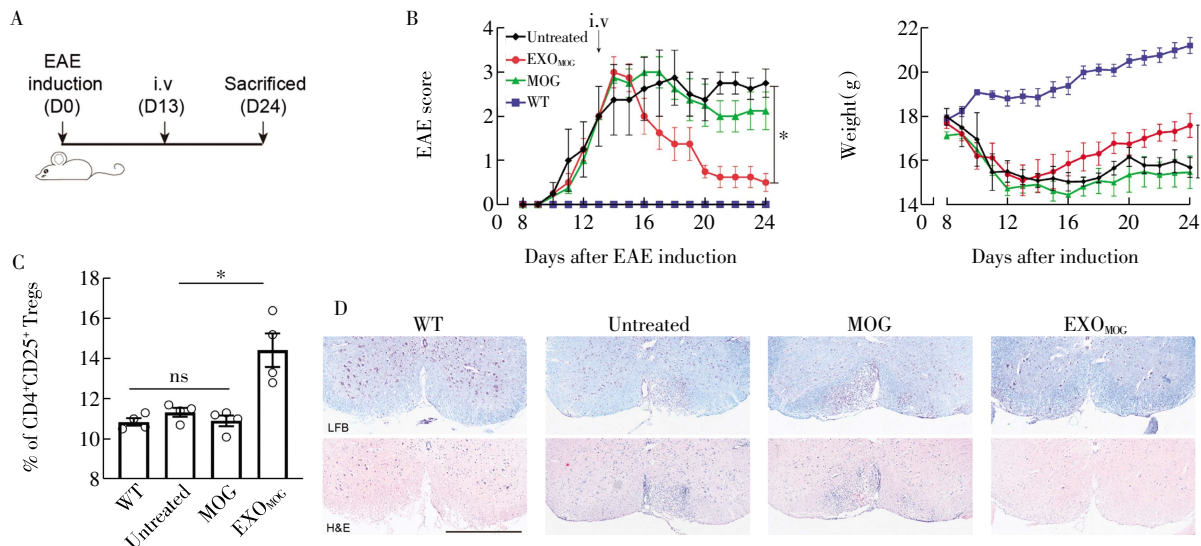
注:A:流式细胞术检测 MOG 和 EXO 的结合效率;B:EXO_{MOG} 的体内分布

图3 EXO_{MOG} 体内靶向性验证

Fig.3 Validation of EXO_{MOG} targeting *in vivo*

给药,实时监测小鼠体重和行为学评分(图4A)。建模后第24天(治疗后11d),行为学评分显示:与未治疗组和MOG组相比,EXO_{MOG}组小鼠的行为学评分为0.5,显著降低($P<0.05$),而未治疗组和MOG组小鼠的临床表现严重程度进展为后肢麻痹,评分为3;EXO_{MOG}组小鼠体重显著增加($P<0.05$,图4B)。EXO_{MOG}组小鼠的平均临床评分显著改善,步态接近正常。进一步使用流式检测各组小鼠脾脏CD4⁺

CD25⁺T淋巴细胞的数量变化,结果显示:与未治疗组和MOG组相比,EXO_{MOG}治疗后小鼠脾脏中的CD4⁺CD25⁺Tregs细胞显著增高($P<0.05$,图4C)。最后,对各组小鼠脊髓病理分析。LFB和HE染色结果显示:相比于野生型小鼠,未治疗组脊髓有大量炎症细胞浸润和脱髓鞘病变;MOG组可见白质区的大量炎症细胞的浸润和脱髓鞘病变;而EXO_{MOG}组未见明显的炎症细胞浸润及脱髓鞘表现(图4D)。

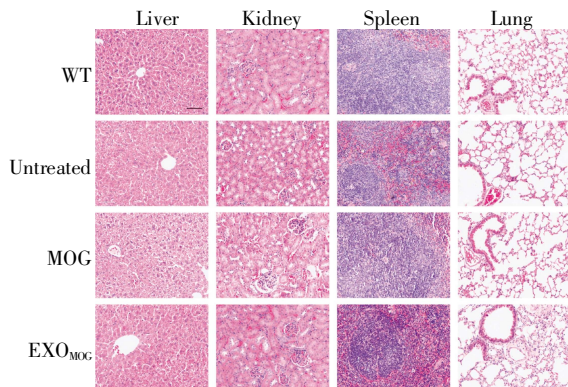


注:A:EXO_{MOG}治疗EAE小鼠示意图;B:EAE小鼠的体重和行为学评分记录;C:流式细胞术检测各组小鼠脾脏CD4⁺CD25⁺T淋巴细胞的表达;D:各组EAE小鼠脊髓LFB染色和HE染色,标尺600 μm

图4 EXO_{MOG}治疗EAE小鼠

Fig.4 The treatment of EXO_{MOG} for EAE mice

2.5 EXO_{MOG}的安全性评估 为了进一步评估EXO_{MOG}体内的安全性,在治疗后11d收样,利用HE染色检测不同处理组肝脏、肾脏、脾脏及肺脏组织形态及病理情况。HE染色结果显示:与野生型和未治疗组相比,EXO_{MOG}组肝窦完整,细胞内未见空泡等明显病变;肾脏肾小球结构完整,未见明显损伤;脾脏和肺部未见明显组织学损伤;在MOG治疗组观察到同样的病理结构(图5)。



注:HE染色评估各组小鼠不同器官组织形态结构(标尺60 μm)

图5 EXO_{MOG}治疗的安全性评估

Fig.5 Safety assessment of EXO_{MOG} treatment

3 讨论

目前,抗原特异性免疫疗法被广泛应用于MS的治疗中^[14],主要是基于DNA疫苗、肽和蛋白质以及纳米颗粒和细胞的策略。这些方法虽然能够在不损害正常免疫的情况下用于诱导耐受性,选择性改善自身免疫性炎症,但其稳定性差,作用时效短,缺乏靶向性,存在一定程度的细胞毒性、与组织相容性较低等问题。然而,EXO具有免疫原性低、生物相容性高和具有可改造功能化的优势,被视为一种天然的生物纳米载体^[15]。EXO主要被动靶向肝,而肝脏具有免疫耐受的特性^[16]。因此,利用EXO负载自身抗原来治疗MS等自身免疫性疾病具有天然优势,对于改善MS治疗的困境具有重要意义。此外,293F细胞系^[17]作为HEK293细胞的一种变体,可以在无血清培养基中悬浮快速生长、大规模产出EXO,减少了血清蛋白共沉淀并且可以满足EXO GMP (Good Manufacturing Practice)及临床治疗产量需求^[18]。更重要的是,本课题组的EXO锚定肽EXP,可实现将自身抗原肽MOG、PLP、MBP等多种CNS抗原高效的负载在EXO表面,从而更加贴近临床MS的治疗^[19]。

本研究探索了 EXO_{MOC} 作为一种新颖的治疗 MS 的策略。研究表明,这种方法在 EAE 小鼠模型中显示出了显著的治疗效果。首先,EXO 的被动靶向:结果表明,EXO 可以有效地将抗原肽递送到肝。本研究还揭示了 EXO_{MOC} 可以增加外周 Tregs 细胞的数量^[20],抑制中枢炎症细胞的浸润^[11],从而减轻 MS 的症状。然而,这种调节作用的具体机制尚不明确。未来的研究需要深入探讨这一点,可能涉及 T 细胞亚群的平衡,或者免疫抑制分子的表达。尽管初步结果显示 EXO 负载抗原肽^[21]是一种有效的 MS 治疗策略,但还需要进行更多的实验来验证这一点。例如,需要在更大规模和更长期的动物实验中评估 EXO_{MOC} 的最优剂量和安全性;需要对 EXO_{MOC} 治疗进行更加全面详细的检测,包括 EXO_{MOC} 治疗后中枢和外周免疫细胞和各种细胞因子的变化;需要设计实验证明 EXO_{MOC} 对 EAE 是否有着预防作用;需要在一些更加复杂、更加贴近临床的 EAE 模型上进行验证 EXO_{MOC} 治疗 MS 的可行性^[22]。

本研究为开发新型 MS 治疗策略提供了有价值的见解。然而,这个领域仍然有许多问题需要解决。期待未来能有更多的研究来进一步探索和优化这种治疗方法。

参考文献:

- [1] JIE Z, KO C J, WANG H, et al. Microglia promote autoimmune inflammation via the noncanonical NF- κ B pathway[J]. *Sci Adv*, 2021, 7(36): eabh0609.
- [2] WING K, SAKAGUCHI S. Regulatory T cells exert checks and balances on self tolerance and autoimmunity[J]. *Nat Immunol*, 2010, 11(1): 7-13.
- [3] ROSENBLUM M D, GRATZ I K, PAW J S, et al. Treating human autoimmunity: current practice and future prospects[J]. *Sci Transl Med*, 2012, 4(125): 125sr1.
- [4] LESLIE M. Immunology. Regulatory T cells get their chance to shine[J]. *Science*, 2011, 332(6033): 1020-1021.
- [5] CARAMBIA A, FREUND B, SCHWINGE D, et al. Nanoparticle-based autoantigen delivery to Treg-inducing liver sinusoidal endothelial cells enables control of autoimmunity in mice[J]. *J Hepatol*, 2015, 62(6): 1349-1356.
- [6] ZHAO X, WU D, MA X, et al. Exosomes as drug carriers for cancer therapy and challenges regarding exosome uptake[J]. *Biomed Pharmacother*, 2020, 128: 110237.
- [7] ZHANG Y, LIU Y, LIU H, et al. Exosomes: biogenesis, biologic function and clinical potential[J]. *Cell Biosci*, 2019, 9: 19.
- [8] VAN DER MEEL R, FENS M H, VADER P, et al. Extracellular vesicles as drug delivery systems: lessons from the liposome field[J]. *J Control Release*, 2014, 195: 72-85.
- [9] GAO X, RAN N, DONG X, et al. Anchor peptide captures, targets, and loads exosomes of diverse origins for diagnostics and therapy[J]. *Sci Transl Med*, 2018, 10(444): eaat0195.
- [10] CONSTANTINESCU C S, FAROOQI N, O'BRIEN K, et al. Experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) as a model for multiple sclerosis (MS)[J]. *Br J Pharmacol*, 2011, 164(4): 1079-1106.
- [11] GETTS D R, MARTIN A J, MCCARTHY D P, et al. Microparticles bearing encephalitogenic peptides induce T-cell tolerance and ameliorate experimental autoimmune encephalomyelitis[J]. *Nat Biotechnol*, 2012, 30(12): 1217-1224.
- [12] LUKSIC F, MIJAKOVAC A, JOSIPOVIC G, et al. Long-term culturing of freestyle 293-F cells affects immunoglobulin G glycome composition[J]. *Biomolecules*, 2023, 13(8): 1245.
- [13] SHI K, LI H, CHANG T, et al. Bone marrow hematopoiesis drives multiple sclerosis progression[J]. *Cell*, 2022, 185(13): 2234-2247.
- [14] KRIENKE C, KOLB L, DIKEN E, et al. A noninflammatory mRNA vaccine for treatment of experimental autoimmune encephalomyelitis[J]. *Science*, 2021, 371(6525): 145-153.
- [15] MA J, ZHANG Y, TANG K, et al. Reversing drug resistance of soft tumor-repopulating cells by tumor cell-derived chemotherapeutic microparticles[J]. *Cell Res*, 2016, 26(6): 713-727.
- [16] THOMSON A W, KNOLLE P A. Antigen-presenting cell function in the tolerogenic liver environment[J]. *Nat Rev Immunol*, 2010, 10(11): 753-766.
- [17] WU T, LIU Y, CAO Y, et al. Engineering macrophage exosome disguised biodegradable nanoplatfor for enhanced sonodynamic therapy of glioblastoma[J]. *Adv Mater*, 2022, 34(15): e2110364.
- [18] KIMIZ-GEBOLOGLU I, ONCEL S S. Exosomes: large-scale production, isolation, drug loading efficiency, and biodistribution and uptake[J]. *J Control Release*, 2022, 347: 533-543.
- [19] LIN M J, SVENSSON-ARVELUND J, LUBITZ G S, et al. Cancer vaccines: the next immunotherapy frontier[J]. *Nat Cancer*, 2022, 3(8): 911-926.
- [20] LUTH S, HUBER S, SCHRAMM C, et al. Ectopic expression of neural autoantigen in mouse liver suppresses experimental autoimmune neuroinflammation by inducing antigen-specific Tregs[J]. *J Clin Invest*, 2008, 118(10): 3403-3410.
- [21] 张杨, 游阿彬, 齐寒, 等. 负载化疗药物的外泌体对肝癌的靶向治疗研究[J]. *天津医科大学学报*, 2021, 27(3): 229-233.
- [22] 赵佳莹, 申艳佳, 杨冉, 等. 多发性硬化药物研发中动物模型研究进展及应用[J]. *中国药理学通报*, 2022, 38(6): 801-806.

(2023-11-21 收稿)