

doi: 10.12452/j.fxcxb.26042303

从精准分离到仿生治疗:中性粒细胞来源囊泡的 生物医学研究进展

周思思, 琚苗苗, 骆乃宸, 刘松琴*

(东南大学 化学化工学院 分析测试中心, 江苏 南京 211189)

摘要: 中性粒细胞作为固有免疫的核心效应细胞, 其释放的细胞外囊泡(NEVs)在细胞间通讯、病理机制及仿生药物递送中展现出巨大潜力。然而, NEVs群体的高度异质性及其与中性粒细胞胞外诱捕网(NETs)的共存, 给其精准分离与功能解析带来了巨大挑战。该文系统综述了从经典差速离心到新兴微流控芯片、DNA纳米结构及智能响应材料等高精度分离分析技术的最新进展; 阐述了通过直接工程化与膜仿生构建等策略, 赋予NEVs化疗、免疫调节及基因治疗等多模态功能, 并详细建立了包含膜标志物保留率、跨膜迁移能力等在内的工程化评价体系。最后, 总结了NEVs在肿瘤、炎症及组织修复等领域的治疗应用, 深入剖析了当前面临的量产标准化、载药效率及安全性评价等核心瓶颈, 并对未来从“被动分离”向“主动智造”的转化路径进行了展望, 旨在为下一代精准仿生纳米药物的开发提供理论依据与技术参考。

关键词: 中性粒细胞; 细胞外囊泡; 分离分析; 微流控芯片; 仿生纳米药物

中图分类号: O646; TP212.2 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004-4957(2026)08-1775-10

From Precise Isolation to Biomimetic Therapy: Biomedical Advances in Neutrophil-derived Vesicles

ZHOU Si-si, JU Miao-miao, LUO Nai-cheng, LIU Song-qin*

(School of Chemistry and Chemical Engineering, Analysis and Testing Center, Southeast University,
Nanjing 211189, China)

Abstract: As core effector cells of innate immune system, neutrophils release extracellular vesicles (neutrophil-derived vesicles, NEVs) that hold great promise in intercellular communication, pathological mechanisms, and biomimetic drug delivery. However, the high heterogeneity of NEV populations and their coexistence with neutrophil extracellular traps (NETs) pose significant challenges for precise isolation and functional characterization. This review systematically summarizes the latest advances in high-precision separation and analysis technologies, ranging from classical differential centrifugation to emerging microfluidic chips, DNA nanostructures, and stimuli-responsive smart materials. Furthermore, it elaborates on engineering strategies, such as direct loading and membrane biomimicry, that endow NEVs with multimodal functionalities including chemotherapy, immunomodulation, and gene therapy. A comprehensive evaluation system for engineered NEVs is established, covering critical metrics like membrane marker retention and transmembrane migration capability. Finally, the therapeutic applications of NEVs in tumors, inflammatory diseases, and tissue regeneration are summarized. The review also critically analyzes the current bottlenecks regarding standardized mass production, loading efficiency, and safety assessment, providing a forward-looking perspective on the transition from “passive isolation” to “active manufacturing” for next-generation precision nanomedicine.

Key words: neutrophils; extracellular vesicles; isolation and analytical technology; microfluidics chip; biomimetic nanodrugs

中性粒细胞是固有免疫的第一道防线^[1]。感染发生后, 该类细胞迅速募集至病灶区, 通过吞噬作

收稿日期: 2026-04-23; 修回日期: 2026-06-08

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(22304024, 22374018)

* 通讯作者: 刘松琴, 教授, 研究方向: 动/植物源细胞外囊泡的分离分析新方法开发、外泌体质谱分析及功能外泌体的生物应用, E-mail: liusq@seu.edu.cn

网络首发日期: 2026-07-08

用、脱颗粒释放抗菌肽和活性氧(ROS),以及形成中性粒细胞胞外诱捕网(NETs)等方式清除病原体^[2-3]。从中性粒细胞释放的囊泡(NEVs)携带了母细胞的膜受体、胞内蛋白及遗传物质,保留了跨屏障迁移、炎症趋化与免疫调节等独特功能^[4-5]。研究表明,NEVs在生理状态下参与维持内环境稳态,而在病理状态下则扮演“双刃剑”角色,既可传递促炎因子加剧组织损伤与肿瘤进展,也可携带抗炎或抗肿瘤分子发挥治疗作用^[6-7]。此外,NEVs天然的炎症“归巢”特性,使其成为极具前景的仿生药物递送载体^[8]。然而,实现NEVs的高纯度分离与精准功能解析是当前该领域的核心瓶颈。一方面,NEVs群体具有高度异质性(图1,包括外泌体、微囊泡、凋亡小体等亚型);另一方面,在复杂的炎症微环境中,NEVs极易受到DNA纤维(即中性粒细胞胞外诱捕网,NETs)与血浆蛋白的干扰。NETs是中性粒细胞激活后释放DNA与抗菌蛋白形成的网状结构,其生成主要依赖活性氧(ROS)和瓜氨酸化组蛋白,分为自杀性(溶胞性)与非自杀性(非溶胞性)两种途径(图1)。由于两者不仅共享多种颗粒蛋白(如中性粒细胞弹性蛋白酶(NE)和髓过氧化物酶(MPO))^[3],还能通过物理吸附形成EV-NET复合物^[9-10],因此必须采用严格的分离方案,以区分脂质双分子层包裹的NEVs与基于染色质的NETs。若未能实现有效分离,将导致对酶学活性或免疫调节功能的误判,因为NETs对DNA酶的敏感性及其在体内的长期存留机制,与NEVs的快速肝脏清除途径存在本质区别。

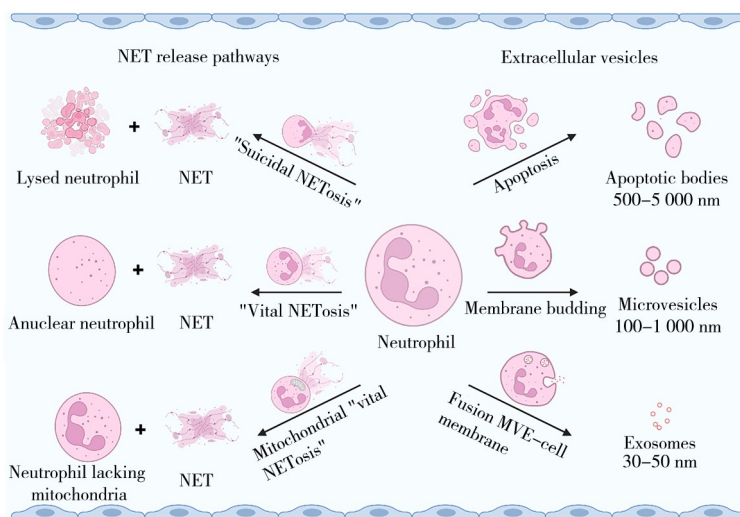


图1 中性粒细胞胞外诱捕网形成机制(左)及释放的细胞外囊泡类别(右)

Fig. 1 Mechanisms of NET formation(left) and EV classes released by neutrophils(right)

本课题组前期在细胞外囊泡(EVs)的分离与诊疗应用方面开展了系统研究,开发了基于双切向过滤的微流控芯片,实现了EVs的高效无损分离^[11];构建了三维微流控芯片与DNA纳米结构,实现了对囊泡表面蛋白及内含miRNA的超灵敏多重检测与原位成像^[12-13]。这些积累为突破NEVs难题提供了有力工具。本文将重点阐述NEVs分离分析技术的演进,探讨其工程化仿生治疗策略,并对挑战与机遇进行展望。

1 NEVs的分离纯化策略

NEVs常与NETs及胞内颗粒共存,常用分离方法有:(1)差速超速离心法(dUC):通过递增离心力沉淀NEVs,是应用最广的基准方法^[14-15]。但难以完全去除密度相近的蛋白聚集体^[16],且高剪切力可能破坏NEVs膜结构^[17];(2)尺寸排阻色谱法(SEC):根据流体动力学半径分离,NEVs先于蛋白洗脱,较好地保持膜完整性与生物活性,适用于蛋白质组学及流式前纯化^[16]。但样品被稀释、通量低^[18];(3)聚合物沉淀法:操作简便、回收率高^[19]。但纯度极低,残留聚合物有细胞毒性,仅适合初步富集;(4)免疫亲和捕获法:利用抗体(如抗CD66b、CD15等)特异性富集,解决异质性问题^[20-21]。但产量低、仅捕获特定亚群,且洗脱有可能损伤囊泡^[22]。

尽管经典方法为NEVs早期研究奠定了基础,但难以区分NEVs与游离DNA-组蛋白的复合物,易共沉淀血浆蛋白且剪切力损伤囊泡。为此,亟需发展基于“双重识别”与“智能材料”的新范式,实

现NEVs的高纯度、高活性捕获。

1.1 基于表面分子与物理特性的双重识别策略

该策略结合物理筛选与特异性识别，解决NEVs与NETs难以分离的难题。利用DNA折纸构建具有纳米级空腔的三脚架结构^[23]，基于“位阻效应”允许脂质囊泡通过但阻挡长链DNA纤维(NETs)，同时偶联抗体，实现特定尺寸范围内选择性捕获外泌体^[24]。这种双重筛选机制能有效剔除NETs干扰，实现NEVs高纯度分离。

利用净电荷可逆曲率感应肽(NIC)识别囊泡膜的高曲率脂质堆积缺陷，实现囊泡的广谱捕获，不受CD9/CD63表达波动影响。NIC具有pH依赖性，酸性条件下结合囊泡，中性时电荷反转并无损释放囊泡^[25]，解决了传统免疫亲和“洗脱难”问题。该技术成本低、稳定性高，且无需依赖中性粒细胞表面标志物，能有效区分复杂炎症样本中的囊泡与NETs成分^[26-27]。

1.2 基于智能纳米材料的免洗脱富集策略

为克服聚合物沉淀法残留毒性及SEC样品稀释的问题，智能材料提供了温和、免洗脱的富集方案。

脂质纳米探针：利用囊泡脂质膜的组成异质性，Wan等^[28]开发的二价胆固醇(B-chol)锚定探(图2A)，不依赖膜蛋白即可广谱标记外泌体，结合磁性富集实现NEVs的快速分离。Tian等^[29]将B-chol标记的DNA锚定物偶联至AuNS@4-MBA@AuSERS探针上，实现了人血清中外泌体的高灵敏检测。He等^[30]进一步结合B-chol锚定与杂交链式反应(HCR)以及酶放大技术，实现了每微升 2.2×10^3 个外泌体的分离与检测。该技术温和无损，尤其适用于高丰度血浆蛋白背景下的NEVs提取。

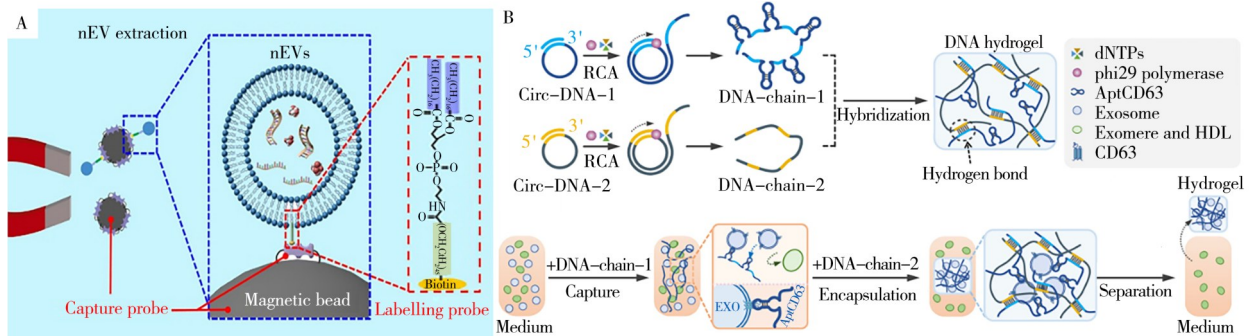


图2 基于智能纳米材料的免洗脱富集策略

Fig. 2 Wash-free enrichment strategy based on smart nanomaterials

A. rapid magnetic separation technology of extracellular vesicles based on lipid nanoprobe^[28]; B. schematic diagram of DNA-based hydrogel for exosome separation^[31] (A. 基于脂质纳米探针的细胞外囊泡快速磁分离技术^[28]; B. 基于DNA的水凝胶用于外泌体分离的示意图^[31])

DNA水凝胶：通过滚环扩增合成高比表面积DNA水凝胶(图2B)，并嵌入外泌体适配体Apt_{CD63}，像“智能渔网”选择性捕获外泌体。捕获后可通过酶切(DNase I)或链置换反应无损释放^[31]，避免SEC后浓缩造成的样本损失，为NEVs异质性研究提供有力工具。

基于分析化学的多维评价体系，本文从样本适用性、回收率、纯度、生物活性完整性及操作通量等关键参数出发，对包括传统方法与新兴技术在内的多种分离策略进行了系统的横向比较(表1)。综合对比显示，虽然差速超速离心等传统方法奠定了基础，但其在纯度控制和亚群分选上的技术短板日益凸显。与之形成鲜明对比的是，DNA折纸、NIC肽、脂质纳米探针及DNA水凝胶等新策略，通过引入特异性识别与智能响应机制，成功解决了传统工艺中杂质共沉淀与活性丧失的难题。新方法在微量样本处理、高纯度提取及功能完整性保护方面的卓越表现，使其在复杂生物样本的囊泡分离中展现出不可替代的优势，代表了该领域技术发展的必然趋势。

表1 传统与新型细胞外囊泡分离方法的比较

Table 1 Comparison of traditional and new extracellular vesicle isolation methods

Methods	Yield	Purity	Time	Scalability	Integrity	Nanoscale contaminant removal
dUC	++	++	+++	+	+	++
SEC	+	+++	++	+++	+++	++
Co-precipitation	+++	+	++	+++	+++	+
Immunoaffinity	++	+++	+	++	+++	+++
DNA tripods	+	+++	+	+	+++	+++

(续表1)

Methods	Yield	Purity	Time	Scalability	Integrity	Nanoscale contaminant removal
NIC	+++	++	+	++	+++	++
Lipid affinity	++	++	+	+	+++	++
Hydrogel	+	+++	+	+	+++	+++

the number of “+” refers to the relative level of each performance metrics

2 NEVs分析策略

2.1 NEVs传统分析方法

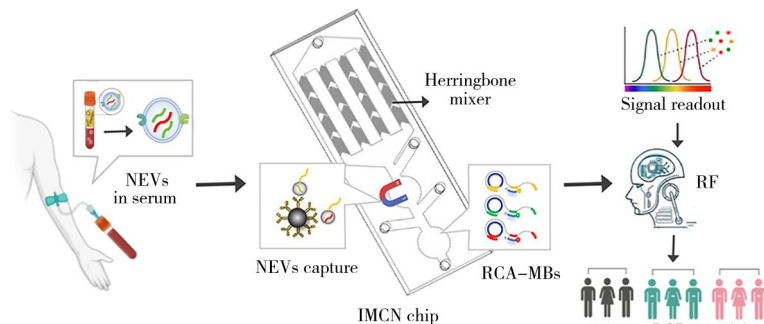
高纯度NEVs需经精准分子表征以解析其功能与临床价值。传统方法如流式细胞术通过检测CD66b等表面抗原确证NEVs的细胞来源^[14,21]，高灵敏度流式技术进一步突破了微小囊泡荧光信号弱的检测瓶颈^[17]。蛋白质印迹分析通用标志物(TSG101、CD63等)与中性粒细胞特异性蛋白(MPO、NE、MMP-9)，可提供分子层面的双重证据^[32-33]。此外，酶联免疫吸附测定(ELISA)与酶活性分析被广泛用于定量检测NEVs携带的炎性因子(如TNF- α 、IL-1 β 、S100A8/A9)及中性粒细胞弹性蛋白酶的活性，从而评估其免疫调节功能^[21,34-35]。

高通量组学成为挖掘生物标志物与机制的前沿。蛋白质组学能够全景式扫描NEVs内的蛋白表达谱，已鉴定膀胱放射性毒性及蛇毒刺激模型中的数十种差异表达蛋白^[34,36]。转录组学与小RNA测序揭示了miR-455-3p在关节炎治疗及脓毒症心肌病中的关键调控作用^[37-38]；脂质组学阐明NEVs关节炎滑膜液中的脂质代谢特征^[39]。传统表征策略(如流式细胞术、蛋白质印迹等)在来源鉴定与靶向定量方面具有高特异性与可靠性，但灵敏度低、样本量大、通量不足；组学技术可全景挖掘，但设备昂贵、数据分析复杂、标准化困难。

2.2 集成式囊泡分离与原位检测新方法

微流控技术作为囊泡分离与分析的前沿平台，正从“复杂样本中囊泡的高效分离”向“囊泡介导的细胞功能模拟”延伸，构建“分离-分析-功能模拟”一体化研究体系，可解决复杂生物样本中囊泡异质性精准解析难和生理功能研究缺失的问题。

2.2.1 集成微流控芯片介导的NEVs分析技术及其疾病诊断应用 张徐团队^[20]开发的集成微流控芯片(IMCN)，仅需10 μ L血清即可实现CD66b⁺ NEVs的免疫分离，并通过CD63适配体识别结合滚环扩增-分子信标信号放大系统，同步检测了NEVs丰度及其携带的miR-223-3p和miR-425-5p(图3)。芯片采用人字形微通道，捕获效率超90%。在临床样本验证中，该NEV特征区分健康对照与胃癌的受试者工作特征曲线下面积(AUC)达0.891，良性胃病与胃癌的AUC为0.857；联合CEA、CA199后AUC提升至0.912，经随机森林模型优化后诊断敏感性达90%、特异性为86.36%，且miR-223-3p高表达与不良预后相关。该平台为胃癌液体活检提供了简便、灵敏的新工具，具有良好的临床转化潜力。

图3 用于血清NEVs分离检测的集成微流控芯片^[20]Fig. 3 Integrated microfluidic chip for serum NEVs isolation and detection^[20]

本课题组长期致力于囊泡分析技术的开发与演进，旨在为NEVs的深度分析提供递进式的解决方案。首先，针对传统超速离心法回收率低(<15%)且易损伤囊泡活性的痛点，开发了基于双切向流过滤的微流控芯片^[11]。该技术实现了EVs的无损高效分离(回收率达77.8%)，并无需标记即可保留囊泡活性。这一技术为NEVs的功能研究奠定了至关重要的基础，确保了后续机制研究的可靠性。其次，为

了突破囊泡内部核酸(miRNA)提取繁琐且易破坏结构的瓶颈,创新性地提出了病毒模拟融合囊泡(FVs)技术^[12]。通过仿生融合策略,该技术实现了囊泡内 miRNA 的免提取原位检测,灵敏度提升45倍。这一原位分析策略为NEVs的多组学(蛋白+核酸)联合分析提供了高效的方法学支撑。最后,为了将上述分析技术转化为对生理病理机制的解析能力,进一步构建了3D微流控肿瘤-血管共培养系统^[40]。该平台迁移并整合了上述微流控操控与检测技术,成功克服了传统2D培养的局限,利用该平台深入解析乳腺癌外泌体的作用机制,发现其通过热休克蛋白HSPs上调ZEB1表达并促进VEGF分泌,从而重塑血管微环境。综上,这一系列基于微流控芯片从高灵敏分析工具到仿生功能模型的技术迁移与迭代,不仅验证了前期EVs分析方法的可靠性,更为深入解析NEVs在复杂生理动态环境中的作用机制提供了强有力的工具支撑。

尽管集成微流控芯片在NEVs的分析与功能研究中展现出卓越性能,但从方法学层面审视,其为NEVs精准分析提供了独特的分析范式。该技术主要在3个维度实现突破:一是样本利用的极限化,依托微尺度层流效应与高比表面积,仅需微量样本即可完成复杂流程,解决了珍贵临床样本(如脑脊液)分析的痛点;二是流程的高度集成化,通过物理空间精密设计,将免疫分离、核酸扩增及信号读出等多步操作集成于单一芯片,实现了“样本进-结果出”的自动化,显著降低了转移损耗与人为误差;三是功能研究的仿生化,能够构建复杂的三维流体环境,用于模拟NEVs在体内的跨屏障迁移与细胞通讯行为,突破了传统2D静态培养的局限。

然而,该方法学在推广应用中仍面临通量与标准化的挑战。受限于微通道物理尺寸,其单次处理量通常低于高通量离心机,难以满足大规模队列筛查需求;同时,芯片制造的批间差异及表面非特异性吸附问题,影响了检测的鲁棒性。未来需致力于开发通用的模块化接口与抗污材料,以推动微流控技术从技术演示向临床常规应用的转化。

2.2.2 NanoPom 捕获-释放方法在中性粒细胞外泌体分析中的应用 Khodayari等^[41]采用 NanoPoms 捕获-释放技术,对 α -1抗胰蛋白酶缺乏症(AATD)患者血浆中的NEVs进行了高纯度串行分离,成功富集了中性粒细胞弹性蛋白酶阳性NEVs NE⁺和阴性NEVs NE⁻亚群。通过整合多组学分析,揭示了AATD患者中性粒细胞的转录重编程及NEVs的促炎代谢特征(图4)。

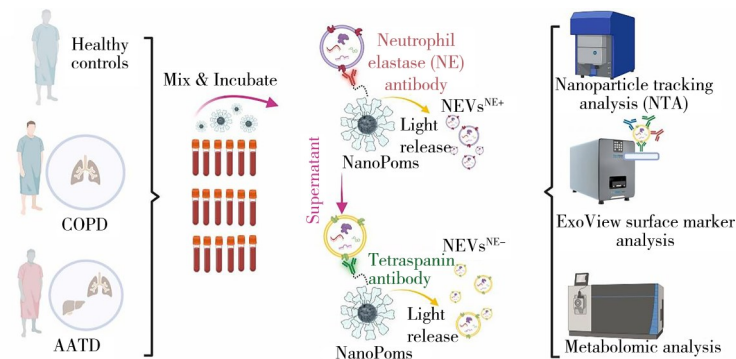


图4 NEVs捕获与释放平台^[41]

Fig. 4 NEVs capture and release platform^[41]

3 NEVs及中性粒细胞膜仿生系统的工程化策略

NEVs的工程化改造,是指通过人工干预手段对其结构、组成或功能进行定向重塑的技术体系。旨在保留其天然靶向优势的同时,赋予其预设的治疗功能或增强其稳定性。天然NEVs虽然具备优异的生物相容性和炎症趋化能力,但其产量受限、载药量低且功能单一,难以满足复杂疾病的治疗需求。因此,实现NEVs从天然提取到智能设计的跨越,构建高性能的仿生纳米药物系统,成为当前研究的核心方向。目前,该领域的工程化策略主要可分为两个方向:(1)天然NEVs的直接工程化;(2)中性粒细胞膜仿生囊泡的构建。

3.1 天然NEVs的直接工程化

直接工程化策略是指利用物理方法将特定的治疗性分子(如抗肿瘤miRNA、抗氧化酶或信号蛋白)

高效装载至囊泡内部,从而赋予其预设的生物学功能。如利用电穿孔、超声或共孵育等物理装载技术,将难以穿透细胞膜的miRNA和阿霉素等化疗药物装载入NEVs,并在外部磁场引导下抑制肿瘤生长^[8]。此外,通过预处理供体中的中性粒细胞(如重组人白细胞介素-36 γ (rmIL-36 γ)预处理),可使其分泌的囊泡富集特定的治疗性分子hsa-miR-101-3p,从而增强其对胃癌细胞的杀伤能力^[42]。

3.2 中性粒细胞膜仿生囊泡的构建

3.2.1 膜结构修饰与融合 通过超声或挤压法,将中性粒细胞膜与功能性囊泡(如干细胞外泌体)融合,旨在保留NEVs天然“归巢”能力的同时,融合其他功能单元以拓展其疗效。例如,由中性粒细胞膜与人脐带间充质干细胞外泌体融合构建的纳米载体,不仅继承了间充质干细胞的组织修复功能,还兼具NEVs的炎症靶向特性,增强了对胃癌及急性肾损伤的治疗效果^[43-44]。类似地,中性粒细胞膜与M2巨噬细胞囊泡融合被用于脊髓损伤治疗,利用中性粒细胞膜的穿越能力到达损伤部位,同时发挥M2巨噬细胞的免疫调节作用^[45]。此外,将中性粒细胞膜包裹于纳米颗粒表面,兼具高载药率与低免疫原性和靶向性,能够有效逃逸单核巨噬系统的吞噬,延长血液循环时间,并精准抑制中性粒细胞弹性蛋白酶的活性^[46-47]。

3.2.2 仿生合成与扩增 天然提取的囊泡产量低,而仿生合成技术通过物理或微流控手段模拟囊泡生成过程,可实现规模化制备。例如,通过氮空化、挤压等物理力破坏细胞膜,形成的活化中性粒细胞外泌体模拟物在糖尿病伤口治疗中表现出高效抗菌能力^[48-49]。产量较天然分泌高出16倍以上。同时,模拟中性粒细胞凋亡行为构建的工程化凋亡小体(eNABs),可主动诱导巨噬细胞进行胞葬作用,促进心脏炎症的消退与组织修复^[50]。

3.3 工程化NEVs及中性粒细胞膜仿生系统特性评价

工程化改造的核心目标是在赋予新功能的同时,最大限度地保留中性粒细胞或囊泡固有的炎症趋化性和免疫逃逸能力。因此,建立一套标准化的评价体系对于判断工程化颗粒是否成功保留了中性粒细胞的特性至关重要。目前的研究主要从理化性质、表面标志物保留、生物学功能及体内命运4个维度进行综合评估。具体而言,(1)膜结构完整性与表面标志物保留率是最直接的证据,通过流式细胞术检测膜表面特异性标志物(如CD66b、CD11b、CCR2)的阳性率,是判断膜来源和完整性的金标准^[21, 51]。在中性粒细胞膜包裹的纳米颗粒研究中,流式检测证实了CD66和CD11b在工程化颗粒表面的高表达,且其表达水平与原始中性粒细胞膜提取物高度相关,直接证明了中性粒细胞膜的成功披覆^[47]。(2)药物包封率与载药量是评价负载药物工程化NEVs的关键指标,通常采用超速离心或尺寸排阻色谱分离游离药物与囊泡,再通过紫外分光光度计或高效液相色谱(HPLC)测定药物浓度^[8];研究表明,通过电穿孔或共孵育法制备的NEVs-miRNA复合物,其包封率通常在20%~40%之间,而通过膜融合技术构建的杂化囊泡,其载药率可显著提升,且能有效保护药物免受核酸酶降解。(3)体外跨膜迁移能力是评价“仿生”功能的核心功能性实验,利用Transwell小室模拟体内血管壁,上室接种工程化囊泡,下室添加炎症因子(如IL-8、fMLP),通过计数迁移至下室的囊泡数量或检测其携带的荧光标记,来量化其趋化迁移能力^[51];多项研究证实,经工程化改造的中性粒细胞囊泡(如N-M2EVs或N-exo)在Transwell实验中表现出与天然中性粒细胞相似的迁移率,能显著响应TNF- α 或MCP-1的刺激,证明其保留了穿越内皮屏障的能力^[45]。(4)靶向性评价则利用近红外荧光染料(如DiR、ICG)或放射性同位素标记工程化囊泡,通过活体成像系统(IVIS)观察其在疾病模型(如肿瘤、脑卒中、关节炎)中的富集情况^[52];例如,在脊髓损伤模型中,中性粒细胞膜仿生囊泡(N-M2EVs)在损伤部位的富集量是未修饰囊泡的数倍,且这种富集在损伤后24~48 h达到峰值,与中性粒细胞浸润的时间窗高度一致^[45]。基于上述多维评价,主流工程化策略在特性保留方面的优缺点总结见表2。建立此类标准化评价体系,将有效推动NEVs从实验室向精准仿生的临床转化。

4 多模态治疗应用

上述工程化改造策略极大地拓展了NEVs的功能边界,使其从单纯的病理介质转变为精准的治疗武器。经过工程化改造的NEVs,凭借其增强的靶向性和功能特异性,已被广泛用于多种重大疾病的治疗,此处的多模态指基于NEVs平台实现的化疗、免疫治疗、基因治疗及联合治疗等多种模式的协同作用。

表2 不同中性粒细胞来源细胞外囊泡(NEV)工程化策略的比较评价

Table 2 Comparative evaluation of different neutrophil-derived extracellular vesicle(NEV) engineering strategies

Engineering strategy	Representative method	Advantage	Limitations & risk	Performance in key evaluation metrics
Direct loading	Electroporation, sonication, co-incubation	Simple operation; maintains natural core structure	Low drug loading efficiency; risk of vesicle rupture/aggregation	Moderate ; retains surface markers but suffers from low encapsulation efficacy
Membrane fusion	Extrusion/sonication-mediated fusion with stem cells or liposomes	Combines functionalities of parent cells; improved drug capacity	Low fusion efficiency; high batch-to-batch heterogeneity	High ; excellent preservation of chemotaxis and transwell migration ability
Surface coating	“Cloaking” nanoparticles with neutrophil membranes	Highly designable; high yield; long circulation (stealth effect)	Inconsistent membrane coverage; potential masking of key ligands (e. g., CD11b/CD18)	High ; high retention of CD11b/CD66b; requires functional validation of ligand activity
Biomimetic synthesis	Nitrogen cavitation, microfluidics	Ultra-high yield (16x); excellent batch consistency; scalable	Simplified composition; potential loss of specific bioactive cargos (miRNAs/enzymes)	Moderate ; good physical mimicry; may lack full immunomodulatory potency of natural NEVs

4.1 肿瘤治疗

肿瘤治疗是 NEVs 工程化应用最为活跃的领域，其核心优势在于能够有效克服肿瘤免疫抑制微环境的靶向递送难题。工程化 NEVs 不仅可作为载体递送阿霉素等化疗药物或抗血管生成因子，显著降低毒副作用^[8,43]；还能通过富集特定的抗肿瘤 miRNA (如 miR-101-3p、miR-182-5p)，抑制肿瘤细胞的干性特征与血管生成，同时激活巨噬细胞的抗肿瘤功能，重塑肿瘤免疫微环境^[42,53]。此外，负载吲哚菁绿 ICG 等近红外染料的工程化 NEVs 可作为高效造影剂，其在肿瘤部位的滞留时间可达游离染料的 5 倍，为术中肿瘤边界的精准识别与彻底切除提供了重要的导航支持^[52]。

4.2 炎症与自身免疫疾病

基于 NEVs 对炎症部位的天然趋向性，可实现抗炎药物的精准递送，从而有效控制炎症反应。在脓毒症与急性肺损伤的治疗中，工程化 NEVs 能够靶向炎症部位，清除 ROS，抑制 NLRP3 炎症小体的激活，进而缓解“细胞因子风暴”，改善预后^[46,53-54]。而在类风湿关节炎等自身免疫性疾病中，工程化 NEVs 则被用于递送 SFRP5 等抗炎因子或抑制软骨降解酶，促进关节软骨修复，并显示出良好的治疗潜力^[37,55]。

4.3 组织再生与修复

工程化 NEVs 在促进组织再生方面也展现出多功能性。在骨与软骨再生领域，NEVs 或其工程化版本可通过传递 miR-455-3p 等关键因子，刺激血管内皮祖细胞增殖，从而加速骨折愈合与软骨再生^[37,56]。在神经修复方面，融合中性粒细胞膜与 M2 型巨噬细胞外泌体构建的仿生纳米递送系统 (N-M2EVs) 在脊髓损伤模型中能重建受损的神经微环境，有效促进神经元存活与轴突再生^[45]。此外，工程化凋亡小体 (eNABs) 可模拟中性粒细胞凋亡，主动诱导巨噬细胞发生胞葬作用，促进巨噬细胞向抗炎 M2 型极化，加速心脏炎症的消退与组织修复^[50]。

4.4 器官移植与保护

在器官移植与保护领域，中性粒细胞来源的 ROS 响应性囊泡 (SOD2-Fer-1@CVs) 展现出重要的临床应用价值。在肺移植过程中，该囊泡能够响应移植器官内的高氧化应激环境，定点释放抗氧化酶和铁死亡抑制剂，显著减轻缺血/再灌注损伤，有效改善移植肺的功能，为提高移植器官的存活率提供了新策略^[54]。

综上所述，工程化 NEVs 凭借其卓越的炎症趋化性与可修饰性，已成功构建起涵盖肿瘤、炎症性疾病、组织再生及器官移植保护的多模态治疗体系 (表 3)。然而，从实验室研究迈向临床转化，仍需跨越量产标准化、载药效率、功能稳定性及安全性评价 4 大核心瓶颈。针对产量低与批间差大的痛点，未来应重点发展基于物理破碎 (如氮空化) 或微流控芯片的仿生合成技术，以实现高均一性、规模化制备；针对载药率低的难题，通过膜融合策略构建杂化囊泡，或利用细胞因子预刺激亲代细胞进行内源性富集，是平衡载药量与囊泡完整性的有效路径；此外，鉴于中性粒细胞的“双刃剑”特性，亟需建立包含促凝血风险及内皮屏障影响在内的标准化安全性评价体系。未来，随着智能响应材料与合成生

物学的深度融合, NEVs 将从单纯的药物载体进化为能够感知微环境、自主调节释药的智能纳米机器人, 推动精准医学进入新纪元。

表 3 工程化中性粒细胞囊泡在疾病治疗中的研究进展

Table 3 Research progress of engineered NEVs in disease treatment

Disease model	Engineering strategy	Core cargo	Main therapeutic mechanism	Reference
Gastric cancer	rmIL-36 γ pretreatment	miR-101-3p	Targeted inhibition of MCL1, promoting tumor cell apoptosis	[42]
Spinal cord injury	Neutrophil membrane + M2 macrophage EVs	Endogenous M2 EV Cargo	Inhibit TNF- α /NF- κ B pathway, alleviate neuroinflammation	[45]
Lung cancer transplant ischemia/reperfusion	SOD2 overexpressing NEVs + ROS-responsive liposomes	Ferrosstatin-1 (Ferroptosis inhibitor)	Scavenge ROS, inhibit ferroptosis, protect endothelial barrier	[54]
Sepsis/acute lung injury	Neutrophil membrane-coated nanoparticles	Sivelestat (neutrophil elastase inhibitor)	Target endothelial cells, inhibit NETs formation	[47]
Myocardial infarction	Neutrophil apoptotic body membrane fused exosomes	Endogenous exosome-related proteins	Enhance homing ability, promote angiogenesis	[57]
Bone repair	Neutrophil membrane-engineered adipose-derived MSC EVs	Endogenous pro-angiogenic factors	Promote endothelial progenitor cell proliferation, accelerate vascularization	[56]
Atherosclerosis	Neutrophil membrane + pericytes	miR-206-3p	Promote cholesterol efflux, inhibit PANoptosis	[51]
Colon cancer/general tumors	Neutrophil membrane + ginseng root-derived exosomes	miRNA-182-5p	Target NOX4/Drp-1/NLRP3 pathway, anti-inflammatory/anti-tumor	[53]
Fracture/bone regeneration	Engineered neutrophil apoptotic bodies (eNABs)	Hexyl 5-aminolevulinate	Induce macrophage efferocytosis, promote inflammation resolution	[50]

5 结论与展望

综上所述, NEVs 研究已实现从基础免疫学机制探索到转化医学应用的跨越式发展。本文展示了分离分析技术的范式转移, 即从依赖超速离心的粗放式提取, 迈向基于微流控与智能材料的高精度“分子筛”时代。这一跃迁使得从全血等复杂生物流体中精准捕获功能亚群并解析其“双重角色”成为可能。

近五年的研究凸显了 NEVs 作为天然纳米载体的独特优势。相较于活细胞治疗, 通过 NEVs 工程化或中性粒细胞膜仿生系统构建的策略规避了细胞寿命短、储存难及潜在免疫原性等问题。其核心优势在于: (1)天然靶向性: 继承“归巢”本能, 穿越血脑屏障; (2)工程化可控性: 易于装载药物、修饰表面, 构建智能响应型纳米药物系统; (3)功能可编程性: 通过筛选特定亚群或预处理策略, 富集特定治疗功能, 实现功能纯粹化。

然而, 该领域迈向临床转化仍面临严峻挑战。其一, 标准化体系的缺失。不同研究在细胞分离、囊泡提取与表征方法上差异显著, 尤其缺乏对外泌体、微囊泡、凋亡小体等亚群的精细区分, 导致数据难以横向比较^[58]; 其次, 分离纯度与分析维度有限。中性粒细胞易激活, 传统离心易引入非囊泡杂质, 需结合 CD66b 等特异性标记物提升分选精度^[16]。现有技术多限于群体分析, 未来需发展单颗粒原位成像与分析技术, 以实时解析囊泡异质性; 其三, 功能的“双刃剑”效应不容忽视。中性粒细胞膜虽能靶向递送, 但其表面分子可能意外激活补体或诱发炎症^[59], 如何在保留靶向性的同时屏蔽免疫原性, 是工程化改造的关键; 其四, 临床转化瓶颈突出。人与鼠中性粒细胞存在种属差异, 动物实验成果难以直接外推^[58], 且大规模标准化生产成本高, 自体来源受限, 异体应用则面临免疫排斥风险。

展望未来, NEVs 研究将聚焦“智能重编程”与“精准化应用”。通过合成生物学手段精准编辑囊泡分泌谱, 有望为癌症、自身免疫性疾病及难治性组织损伤提供新一代精准疗法。尽管仍需攻克标准化缺失、智能载体构建及联合疗法探索等挑战, 但随着多学科交叉融合与技术突破, 中性粒细胞仿生囊泡有望成为下一代精准医疗的核心工具, 为重大疾病治疗提供全新范式。

参考文献:

- [1] Giese M A, Hind L E, Huttenlocher A. *Blood*, **2019**, 133(20): 2159–2167.
- [2] Sheneman K R, Cummins T D, Merchant M L, Hood J L, Uriarte S M, Lawrenz M B. *J. Extracell. Vesicles*, **2025**, 14(4): e70074.
- [3] Pfister H. *Diagnostics*, **2022**, 12(7): 1715.

- [4] Hong C W. *Immune Netw.*, **2018**, 18(6): e43.
- [5] Li L Y, Zuo X X, Liu D, Luo H, Zhu H L. *Front. Pharmacol.*, **2021**, 12: 727901.
- [6] Jurczyk W, Jablonska J, Smolarz M. *Biochim. Biophys. Acta Mol. Cell Res.*, **2026**, 1873(3): 120126.
- [7] Zhang J H, Gu J M, Wang X, Ji C, Yu D, Wang M Y, Pan J M, Santos H A, Zhang H B, Zhang X. *Adv. Mater.*, **2024**, 36(19): 2310318.
- [8] Zhang J H, Ji C, Zhang H B, Shi H, Mao F, Qian H, Xu W R, Wang D Q, Pan J M, Fang X J, Santos H A, Zhang X. *Sci. Adv.*, **2022**, 8(2): eabj8207.
- [9] Wang Y Z, Luo L T, Braun O, Westman J, Madhi R, Herwald H, Mörgelin M, Thorlacius H. *Sci. Rep.*, **2018**, 8: 4020.
- [10] Mohan A S, Radhakrishnan S, Aswamy M G, Mohan N, John A J, Anie Y. *Thromb. Res.*, **2026**, 260: 109658.
- [11] Hua X, Zhu Q, Liu Y, Zhou S S, Huang P Z, Li Q, Liu S Q. *Anal. Chim. Acta*, **2023**, 1258: 341160.
- [12] Zhou S S, Hu T, Han G H, Wu Y F, Hua X, Su J, Jin W W, Mou Y P, Mou X Z, Li Q, Liu S Q. *Small*, **2020**, 16(48): 2004492.
- [13] Zhou S S, Shan F S, Cao Y, Huang P Z, Yang H T, Liu S Q. *Anal. Chem.*, **2024**, 96(34): 13928–13935.
- [14] Contreras E L, Gao F Y, Du Y P, Jiyacharoen J, Kiser J, Kern T. *J. Biol. Chem.*, **2024**, 300(3): S407–S408.
- [15] Mainguy-Seers S, Beaudry F, Fernandez-Prada C, Martin J G, Lavoie J P. *Cells*, **2022**, 11(21): 3347.
- [16] Bonifay A, Robert S, Champagne B, Petit P R, Eugene A, Chareyre C, Duchez A C, Velier M, Fritz S, Vallier L, Lacroix R, Dignat-George F. *J. Extracell. Vesicles*, **2022**, 11(4): e12204.
- [17] Visan K S, Lobb R J, Ham S, Lima L G, Palma C, Edna C P Z, Wu L Y, Gowda H, Datta K K, Hartel G, Salomon C, Möller A. *J. Extracell. Vesicles*, **2022**, 11(9): 12266.
- [18] Sidhom K, Obi P O, Saleem A. *Int. J. Mol. Sci.*, **2020**, 21(18): 6466.
- [19] Gemoll T, Rozanova S, Roder C, Hartwig S, Kalthoff H, Lehr S, ElSharawy A, Habermann J K. *J. Clin. Med.*, **2020**, 9(5): 1429.
- [20] Yu D, Gu J M, Zhang J H, Wang M Y, Ji R B, Feng C L, Santos H A, Zhang H B, Zhang X. *ACS Nano*, **2025**, 19(10): 10078–10092.
- [21] Richter R, Sari E, Stacks D, Lewis C, Smith J, Xu N Y, Langster T, Finley D, Margaroli C, Genschmer K R. *STAR Protoc.*, **2025**, 6(2): 103739.
- [22] Theel E K, Schwaminger S P. *Int. J. Mol. Sci.*, **2022**, 23(16): 9004.
- [23] Ouyang Y, Zhang P, Willner I. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2024**, 63(41): e202411118.
- [24] Iinuma R, Chen X X, Masubuchi T, Ueda T, Tadakuma H. *J. Am. Chem. Soc.*, **2024**, 146(15): 10293–10298.
- [25] Kawano K, Kuzuma Y, Yoshio K, Hosokawa K, Oosugi Y, Fujiwara T, Yokoyama F, Matsuzaki K. *Anal. Chem.*, **2024**, 96(9): 3754–3762.
- [26] Gori A, Frigerio R, Gagni P, Burrello J, Panella S, Raimondi A, Bergamaschi G, Lodigiani G, Romano M, Zandrini A, Radeghieri A, Barile L, Cretich M. *Adv. Sci.*, **2024**, 11(29): e2400533.
- [27] Gori A, Romanato A, Bergamaschi G, Strada A, Gagni P, Frigerio R, Brambilla D, Vago R, Galbiati S, Picciolini S, Bedoni M, Daaboul G G, Chiari M, Cretich M. *J. Extracell. Vesicles*, **2020**, 9(1): 1751428.
- [28] Wan Y, Cheng G, Liu X, Hao S J, Nisic M, Zhu C D, Xia Y Q, Li W Q, Wang Z G, Zhang W L, Rice S J, Sebastian A, Albert I, Belani C P, Zheng S Y. *Nat. Biomed. Eng.*, **2017**, 1(4): 0058.
- [29] Tian Y F, Ning C F, He F, Yin B C, Ye B C. *Analyst*, **2018**, 143(20): 4915–4922.
- [30] He F, Liu H, Guo X G, Yin B C, Ye B C. *Anal. Chem.*, **2017**, 89(23): 12968–12975.
- [31] Tang J P, Jia X M, Li Q, Cui Z, Liang A Q, Ke B, Yang D Y, Yao C. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **2023**, 120(28): e2303822120.
- [32] Muriana Tintor E, Sharif A, Moreno-Sanchez L, Antwi-Baffour S, Inal J M. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **2026**, 813: 153614.
- [33] Arteaga-Blanco L, Beidokhti M N, Villalba N, Swaby L, Cha B J, Kayisli C, Yao Y, Wu M H, Yuan S Y. *Fluids Barriers CNS*, **2026**, 23(1): 6.
- [34] Molony R D, Akash M M H, Kerns S L, Marples B, Groves A, Dhinakaran C, Nichols L E, Lee Y F. *Cancer Lett.*, **2025**, 631: 217931.
- [35] Chen A Q, Pan A X, Liu J, Zhang D Q, Chen J Y, Zhang J. *Int. J. Gen. Med.*, **2025**, 18: 4753–4762.
- [36] Serrath S N, Pontes A S, Paloschi M V, Silva M D S, Lopes J A, Boeno C N, Silva C P, Santana H M, Cardozo D G, Ugarte A V E, Magalhaes J G S, Cruz L F, Setubal S S, Soares A M, Cavecci-Mendonca B, Santos L D, Zuliani J P. *Toxins*, **2023**, 15(11): 625.
- [37] Thomas B L, Montero-Melendez T, Oggero S, Kaneva M K, Chambers D, Pinto A L, Nerviani A, Lucchesi D, Austin-Williams S, Hussain M T, Pitzalis C, Allen B, Malcangio M, Dell'Accio F, Norling L V, Perretti M. *Arthritis Rheumatol.*, **2024**, 76(12): 1705–1718.
- [38] Ye R Z, Lin Q Y, Xiao W K, Mao L X, Zhang P F, Zhou L S, Wu X X, Jiang N N, Zhang X H, Zhang Y H, Ma D Q, Huang J H, Wang X Y, Deng L H. *Cell Death Discov.*, **2023**, 9: 19.

- [39] Varela L, Mol S, Taanman-Kueter E W, Ryan S E, Taams L S, de Jong E, van Weeren P R, van de Lest C H A, Wauben M H M. *Biochim. Biophys. Acta Mol. Cell Biol. Lipids*, **2024**, 1869(7): 159534.
- [40] Zhou S S, Shan F S, Zhang Y, Cao Y, Cen J H, Kaji N, Liu S Q. *Lab Chip*, **2026**, 26(6): 1820–1829.
- [41] Greenberg Z F, Oshins R, Serban K, Bazargani S F, Garrett T J, Casanova N G, Garcia J G N, He M, Khodayari N. *J. Extracell. Vesicles*, **2025**, 6: 100093.
- [42] Wang J Y, Zhang J H, Qian Y, Wang Y Z, Wang S W, Fan B Y, Shi J Y, Wang J, Meng S T, Dong X T, Fu M, Zhang X X, Ji R B, Fang X J, Zhang X. *Cancer Cell Int.*, **2026**, 26(1): 26.
- [43] Tang Y T, Shen Y, Zang X Y, Wu P P, Li L L, Qian H, Zhang X, Xu W R, Jiang J J. *J. Control. Release*, **2025**, 383: 113828.
- [44] Wu P P, Tang Y T, Jin C, Wang M, Li L L, Liu Z, Shi H, Sun Z X, Hou X M, Chen W Y, Xu W R, Qian H. *J. Nanobiotechnol.*, **2022**, 20(1): 353.
- [45] Shang Y, Wang W, Zhang T, Qi E, Jiang L, Liu H, Wang Q, Feng S. *Biomater. Adv.*, **2026**, 181: 214627.
- [46] Ma W J, Wu D, Long C C, Liu J Y, Xu L W, Zhou L H, Dou Q L, Ge Y Z, Zhou C C, Jia R P. *J. Control. Release*, **2024**, 370: 66–81.
- [47] Wei J X, Zhong A J, Zhang Y T, Deng E H, Mo H Z, Zhao H Y, Huang J Y, Peng H D, Zhang K Y, Chen X H, Mao H F, Chen Y X, Zhu Y C. *Pharmaceutics*, **2025**, 17(6): 766.
- [48] Yu Y Z, Jin H F, Li L B, Zhang X, Zheng C F, Gao X, Yang Y X, Sun B W. *J. Nanobiotechnol.*, **2023**, 21(1): 308.
- [49] Gao J, Wang S H, Wang Z J. *Biomaterials*, **2017**, 135: 62–73.
- [50] Bao L L, Dou G, Tian R, Lv Y J, Ding F, Liu S Y, Zhao R F, Zhao L, Zhou J, Weng L, Dong Y, Li B, Liu S Y, Chen X, Jin Y. *Bioact. Mater.*, **2022**, 9: 183–197.
- [51] Wei X, Guan X, Ma X, He X, Wang S, Zhou G, Liu H, Fan Y. *Adv. Funct. Mater.*, **2025**, 35(47): 2503873.
- [52] Ghoshal B, Patkulkar P A, Bhatt P, Rana S, Sinharay S, Jhunjhunwala S. *ACS Appl. Bio Mater.*, **2025**, 8(5): 4132–4139.
- [53] Ma C H, Liu K, Wang F, Fei X C, Niu C C, Li T, Liu L M. *Int. J. Surg.*, **2024**, 110(1): 72–86.
- [54] Yuan H X, Ye Y Y, Shen P, Zhang J, Meng Q F, Chen Y, Xu X, Zhang X L, Rao L, Fan Z J, He J X. *Adv. Sci.*, **2025**, 12(42): e06127.
- [55] Kitahara K, Ebata T, Liyile C, Nishida Y, Ogawa Y, Tokuhito T, Shiota J, Nagano T, Takasuka T E, Endo T, Shimizu T, Alhasan H, Asano T, Takahashi D, Homan K, Onodera T, Kadoya K, Terkawi M A, Iwasaki N. *Cell Commun. Signal.*, **2024**, 22(1): 569.
- [56] Wang L, Yang L Y, Tian L, Guo B L, Dai T Q, Lv Q X, Xie J R, Liu F W, Bao H, Cao F, Liu Y, Gao Y, Hou Y, Ye Z, Wang S Q, Zhang Q Y, Kong L, Cai B L. *Biomaterials*, **2025**, 319: 123215.
- [57] Wang J J, Li J J, Su G, Zhang Y B, Wang Z, Jia Y J, Yu Q, Shen Z Y, Zhang Y X, Yu Y S. *Regen. Biomater.*, **2025**, 12: rbae145.
- [58] Li L Y, Zuo X X, Liu D, Luo H, Zhu H L. *J. Dermatol. Sci.*, **2020**, 98(2): 88–97.
- [59] Hsu A Y, Huang Q, Pi X, Fu J, Raghunathan K, Ghimire L, Balasubramanian A, Xie X, Yu H, Loison F, Haridas V, Zha J, Liu F, Park S Y, Bagale K, Ren Q, Fan Y, Zheng Y, Cancelas J A, Chai L, Stowell S R, Chen K, Xu R, Wang X, Xu Y, Zhang L, Cheng T, Ma F, Thiagarajah J R, Wu H, Feng S, Luo H R. *Cell*, **2025**, 188(6): 1623–1641.

(责任编辑: 盛文彦)