

· 技术与方法 ·

一种高产外泌体的CHO工程化细胞的构建

王如萍^{1,2#} 漫未玲^{2#} 王丽娟^{1#} 李响² 朱天昊² 何盈盈^{1,2} 林艳丽² 吴晓洁² 崔雨萌²
黎扬华² 庞芳² 李莹² 马岳² 周成江^{1*} 王友亮^{2*}

(¹内蒙古科技大学包头医学院, 包头 014060; ²军事科学院军事医学研究院前沿生物技术实验室, 北京 100071)

摘要 外泌体作为天然药物递送载体, 具有高生物相容性、稳定性及低免疫原性的优势, 在生物医学研究中应用价值显著, 但其天然分泌产量低, 严重限制了其临床转化。该研究利用中国仓鼠卵巢-K1(CHO-K1)细胞高效表达外源基因的能力, 结合重组酶介导的盒式交换(RMCE)技术, 定点整合了调控外泌体分泌的关键基因 *NADB*(调控能量代谢)、*STEAP3*(调控囊泡形成)和 *SDC-4*(促进外泌体分泌), 构建了稳定高产外泌体的 CHO-K1 工程化工具细胞株。结果显示, 定点整合外泌体促进器对细胞生长无影响。经纳米粒子追踪分析(NTA)检测发现, 单克隆细胞株 clone1 的外泌体颗粒数较野生型 CHO-K1 细胞增加约 5 倍。因此, 本研究成功构建了 CHO-K1 工程化外泌体生产系统, 实现了外泌体的稳定、高效分泌, 为外泌体的规模化生产奠定了基础。

关键词 CHO-K1 细胞; 工程化改造; 外泌体

Construction of an Engineered CHO Cell Line for Enhanced Exosome Secretion

WANG Ruping^{1,2#}, MAN Weiling^{2#}, WANG Lijuan^{1#}, LI Xiang², ZHU Tianhao², HE Yingying^{1,2}, LIN Yanli², WU Xiaojie²,
CUI Yumeng², LI Yanghua², PANG Fang², LI Ying², MA Yue², ZHOU Chengjiang^{1*}, WANG Youliang^{2*}

(¹Baotou Medical College, Inner Mongolia University of Science and Technology, Baotou 014060, China;

²Laboratory of Advanced Biotechnology, Academy of Military Medical Sciences, Academy of Military Sciences, Beijing 100071, China)

Abstract Exosomes, as natural drug delivery carriers, possess advantages such as high biocompatibility, stability, and low immunogenicity, demonstrating significant application potential in biomedical research. However, their naturally low secretion yield severely limits clinical translation. In this study, the efficient exogenous gene expression capability of CHO-K1 (Chinese hamster ovary-K1) cells was combined with RMCE (recombinase-mediated cassette exchange) technology to achieve site-specific integration of key genes involved in exosome secretion regulation, including *NADB* (energy metabolism regulation), *STEAP3* (vesicle formation regulation), and *SDC-4* (exosome secretion promotion). A stable engineered CHO-K1 tool cell line with enhanced exosome production was thereby established. The results showed that site-specific integration of exosome enhancers had no adverse effect on cell growth. NTA (nanoparticle tracking analysis) further demonstrated that the number of exosome particles secreted by the monoclonal cell line clone1 increased by approximately fivefold compared with wild-type CHO-K1 cells. Therefore, this study successfully established an engineered exosome production system based on CHO-K1 cells to

收稿日期: 2026-03-25

接受日期: 2026-05-08

内蒙古自然科学基金面上项目(批准号: 2025MS03120)和国家自然科学基金地区项目(批准号: 32560245)资助的课题

*通信作者。E-mail: 81827358@qq.com; wang_you_liang@aliyun.com

Received: March 25, 2026

Accepted: May 8, 2026

This work was supported by the Inner Mongolia Natural Science Foundation (Grant No.2025MS03120) and the National Natural Science Foundation of China (Grant No.32560245)

*Corresponding authors. E-mail: 81827358@qq.com; wang_you_liang@aliyun.com

achieve stable and high-efficiency exosome secretion, laying a foundation for large-scale exosome manufacturing.

Keywords CHO-K1 cells; engineering modification; exosomes

外泌体(exosomes)是细胞分泌的直径在30~150 nm之间的小囊泡,在细胞间通信中发挥重要作用^[1]。外泌体不仅具有安全性、低免疫原性等特性^[2],还具备独特的穿透血脑屏障(blood-brain barrier, BBB)的能力,能高效递送小干扰RNA(small interfering RNA, siRNA)等核酸药物、蛋白质疫苗乃至多种小分子化合物,实现神经系统疾病的精准治疗^[3]。然而外泌体在各种细胞中的分泌量均较低,难以满足临床的治疗性需求^[4-5],传统策略如细胞应激诱导或化学增强剂处理虽能短暂提升外泌体产量,但极易引发细胞凋亡或外泌体功能损伤^[6]。因此,构建可高效促进外泌体生成的工程化细胞体系,实现外泌体的稳定、可持续高效分泌对外泌体的临床应用至关重要。

工程化外泌体是指利用生物工程技术进行基因改造与分子修饰获得的功能性外泌体,通过工程化改造手段可以构建外泌体工具细胞株,实现多批次、多类型药物的高效递送^[7]。传统的外泌体工程化改造技术,如病毒载体或电穿孔介导的基因递送等随机整合方式有着整合位点不可控、表达稳定性差以及插入突变的风险,这些问题严重限制了工程化外泌体在临床应用中的安全性^[8-9]。重组酶介导的盒式交换(recombinase-mediated cassette exchange, RMCE)技术是一种外源基因定点整合技术:先在亲本细胞基因组中预先插入含loxP或FRT位点的定点置换盒,再借助Cre或Flp重组酶,使携带同源位点的交换质粒与基因组上的预定位点发生定向重组与替换,从而实现外源基因精准、定点、稳定整合^[10]。该工程化改造策略可大幅提升转基因表达的稳定性、可重复性,还可实现多轮基因的定点整合^[11-12],目前,基于RMCE技术的定点整合系统已在多种动物模型及人源细胞中得到广泛应用,证实其在基因功能研究与疾病模型构建中具有显著优势。

中国仓鼠卵巢-K1(Chinese hamster ovary-K1, CHO-K1)细胞是生物医药领域应用最为广泛的哺乳动物表达系统,具有成熟的培养工艺和高表达外源基因的能力^[13]。CHO-K1细胞基因组中含有*Rosa26*(gene trap ROSA 26)安全位点,该位点具备基因编辑效率高、外源基因稳定表达的优势,可较大

程度保证外源基因的稳定整合与持久表达^[14],同时,源于CHO-K1细胞的外泌体在药物、蛋白质等治疗性分子的递送方面也具有良好应用潜力^[15-16]。

实验室前期设计了包含基因置换位点(loxP/FRT)的“着陆架”(landing pad)基因元件(loxP-BSD-lox5171-PGK-FRT),利用CRISPR/Cas9技术,将侧翼携带CHO-K1细胞*Rosa26*位点同源臂的着陆架序列定点整合至*Rosa26*安全位点,成功构建了可用于外源基因定点插入的基因编辑工具细胞株CHO-K1-LP^[17]。由于CHO-K1细胞天然外泌体分泌量较低,为实现其外泌体的稳定、高效分泌,我们在CHO-K1-LP细胞的基础上,通过RMCE技术加载外泌体促进基因,这不仅可以规避随机整合方式的不足,还可实现CHO-K1细胞外泌体的稳定、高效分泌。

NADB(nicotinamide adenine dinucleotide biosynthesis)、前列腺六跨膜上皮抗原3(six-transmembrane epithelial antigen of prostate 3, *STEAP3*)、多配体蛋白聚糖-4(syndecan-4, *SDC-4*)为已报道的与外泌体分泌密切相关的基因^[18]。*NADB*参与细胞内氧化还原代谢调控,调控NAD⁺代谢,促进囊泡生成,其过表达可增强外泌体的能量供应,提升其在复杂微环境中的存活率^[19-21]; *STEAP3*是一种金属还原酶,可通过调节铁代谢影响肿瘤细胞的增殖与凋亡,介导铁还原,增强膜融合,参与外泌体的生物合成^[22-24]; *SDC-4*基因编码跨膜蛋白多配体蛋白聚糖-4,该蛋白参与细胞黏附、信号转导与细胞骨架重塑,调控外泌体出芽,对*SDC-4*进行基因工程改造,可增强外泌体的靶向递送能力^[25-27]。本研究通过RMCE技术,将3个外泌体分泌促进基因协同整合至CHO-K1-LP细胞株,实现多基因在同一位点的定点整合,最终促使CHO-K1细胞稳定、高效分泌外泌体。

1 材料与方法

1.1 实验材料

本研究中使用的细胞培养相关试剂包括:胎牛血清(Gibco公司,货号:A5670701)、青霉素-链霉素双抗(100 U/mL青霉素和100 μg/mL链霉素;Gibco公司,货号:15140-122)、DMEM培养基(Gibco公司,货号:C11995500BT)、杀稻瘟菌素S(blasticidin S;

Gibco公司, 货号: A11139-03)、遗传霉素(geneticin; Gibco公司, 货号: 10131-027)和转染试剂FuGENE® HD(Promega公司, 货号: E2311)。

分子克隆相关限制性内切酶均购自纽英伦生物技术有限公司, 具体包括 *Age* I(货号: R3552S)、*Xba* I(货号: R0145T)、*Not* I(货号: R3189S)、*Pme* I(货号: R0560S)、*Sca* I(货号: R3156S)、*Bam*H I(货号: R3136S)和*Nde* I(货号: R0111V); 本研究还用到了T4连接酶(Promega公司, 货号: M180A)。

蛋白提取与检测相关试剂包括: 蛋白酶抑制剂(ThermoFisher Scientific公司, 货号: 87785)、蛋白裂解液(ThermoFisher Scientific公司, 货号: 87787)、BCA蛋白定量试剂盒(ThermoFisher Scientific公司, 货号: 23225)、蛋白上样缓冲液(康为世纪生物科技有限公司, 货号: CW0027S)、TSG101抗体(Cell Signaling Technology公司, 货号: 72312)、Alix抗体(Cell Signaling Technology公司, 货号: 92880)、山羊抗鼠二抗(Proteintech公司, 货号: RGAM0001)、山羊抗兔二抗(Proteintech公司, 货号: RGAR0001)、化学发光试剂[翌圣生物科技(上海)股份有限公司, 货号: 36222ES76]。实验过程中使用的有机溶剂包括: TRIzol试剂(Invitrogen公司, 货号: 15596018CN)、氯仿(国药集团化学试剂有限公司, 货号: 10006892)、异丙醇(国药集团化学试剂有限公司, 货号: 80109218)、乙醇(国药集团化学试剂有限公司, 货号: 10009218)。

本研究使用的主要仪器设备包括: 流式细胞仪(ThermoFisher Scientific公司, 型号: Attune NxT)、NanoDrop ONE核酸检测仪(ThermoFisher Scientific公司, 型号: ND-ONE)、细胞培养箱(ThermoFisher Scientific公司, 货号: 3111)、超速离心机(Beckman公司, 型号: Optima XPN-100)、透射电子显微镜(transmission electron microscopy, TEM; HITACHI公司, 型号: HT7700)、共聚焦显微镜(Nikon公司, 型号: TI2-E)、纳米粒子追踪分析仪(Particle Metrix公司, 型号: Zeta view PMX120-Z)、实时荧光定量PCR(quantitative real-time polymerase chain reaction, qRT-PCR)仪(Bio-Rad公司, 型号: CFX96™)、PCR仪(Bio-Rad公司, 型号: T100™ Thermal Cycler)、金属浴(Eppendorf公司, 型号: Thermo Mixer C)、酶标仪(Molecular Devices公司, 型号: SpectraMax i3x)。

1.2 细胞培养

所有细胞均使用含10%胎牛血清(fetal bovine

serum, FBS)、100 U/mL青霉素和100 μg/mL链霉素的DMEM培养基培养。CHO-K1-LP细胞株培养基中需额外添加6 μg/mL杀稻瘟菌素S, 定点整合booster质粒细胞株培养基中需额外添加500 μg/mL遗传霉素, 所有细胞均于37 °C、5% CO₂的恒温保湿细胞培养箱中培养。

1.3 质粒构建

1.3.1 外泌体促进器质粒booster构建 本研究合成了含有基因置换位点loxP/lox5171、抗性筛选元件(*Neo*)等的载体骨架(RMCE-CMV-MCS-FRT)。使用限制性内切酶*Age* I、*Xba* I进行双酶切, 以人源cDNA为模板通过PCR扩增出外泌体促进基因*NADB*、*STEAP3*、*SDC-4*的编码区, 之后利用重叠PCR技术用IRES(internal ribosome entry site)将这3个基因进行串联, 接着使用T4连接酶(T4 DNA ligase, 15 °C、12 h)将其与双酶切后的载体骨架进行连接, 最后通过测序及使用*Not* I、*Pme* I、*Sca* I进行酶切鉴定, 确定质粒booster构建无误。

1.3.2 CD63-Nluc荧光报告质粒的构建 选用实验室原有的表达NanoLuc® luciferase的载体骨架(*pCDH-CMV-Nluc-Puro*), 使用限制性内切酶*Bam*H I、*Xba* I进行双酶切, 以人源cDNA为模板通过PCR扩增CD63的编码区并在两端引入*Bam*H I、*Xba* I酶切位点, 之后通过T4连接酶(15 °C、12 h)将其与双酶切后的载体进行连接。通过测序及使用*Bam*H I、*Nde* I进行酶切鉴定, 确定CD63-Nluc荧光报告质粒构建无误。

1.4 定点整合booster细胞株的构建

1.4.1 G418抗生素加压浓度筛选 将CHO-K1-LP细胞提前一天接种于24孔培养板中, 待培养至密度达70%~80%时, 换液并改用添加G418的培养基开展药物加压筛选, 设置G418终浓度梯度: 100、300、500、700、900、1000 μg/mL, 各组细胞分别采用对应浓度培养基加压培养筛选48 h。通过镜下观察发现, 300 μg/mL时CHO-K1-LP细胞仍有少量存活, 500 μg/mL时CHO-K1-LP细胞全部死亡。最终选取500 μg/mL G418对转染质粒booster的细胞进行加压筛选。

1.4.2 细胞转染质粒booster 将CHO-K1-LP细胞提前一天接种于6孔培养板中, 待培养至密度达70%~80%时可进行质粒转染。首先配制病毒感染溶液: 在2 mL无抗性培养基(含10% FBS的DMEM

培养基)中加入10 μL 带有绿色荧光蛋白(green fluorescent protein, GFP)标记的Cre腺病毒(AdM-CMV-Cre-mCMV-copGFP, 滴度为 1.4×10^{10} PFU/mL),之后吸弃细胞原有培养基, PBS清洗后加入病毒感染溶液, 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养箱中孵育24 h后弃去感染溶液, PBS清洗后继续更换为无抗性培养基, 按照FuGENE[®] HD转染试剂说明方法配制质粒转染混合液(150 μL Opti-MEM培养基+4 μg booster质粒+10 μL FuGENE[®] HD)并将其加入细胞培养板中, 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养箱中孵育24 h后, 将培养基更换为含500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ G418抗生素的培养基以进行加压筛选。

1.4.3 整合质粒booster细胞的单克隆细胞筛选
待细胞培养到状态稳定时, 吸弃原有培养基, 加入PBS清洗后弃去上清液, 加入0.25%不含EDTA的胰蛋白酶于室温下消化2~3 min, 显微镜下观察细胞消化完成后, 加入1 mL含500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ G418抗生素的培养基终止消化。将细胞悬液混匀后使用细胞计数仪进行细胞计数, 用培养基将细胞稀释至 $1 \times 10^3/\text{mL}$, 吸取130 μL 稀释好的细胞混悬液于96孔板中, 在37 $^{\circ}\text{C}$ 培养箱中培养, 1~2周后在显微镜下观察, 筛选出单克隆细胞株, 将其传代至新的细胞培养板中继续培养, 待细胞状态稳定后进行基因组与RNA水平验证, 获得稳定单克隆细胞株。

1.5 细胞转染CD63-Nluc荧光报告质粒

将细胞提前一天接种于24孔培养板中, 待培养至密度达70%~80%时, 更换为无抗性普通培养基, 将CD63-Nluc质粒(0.5 $\mu\text{g}/\text{孔}$)通过FuGENE[®] HD(2 $\mu\text{L}/\text{孔}$)转入细胞中, 放入37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 培养箱中继续培养, 6 h后更换为无血清DMEM培养基, 于37 $^{\circ}\text{C}$ 培养箱中继续培养, 60 h后收取细胞上清进行荧光素检测。

1.6 荧光素酶报告实验

细胞转染CD63-Nluc质粒后, 将收集的细胞上清液转移至离心管中, 梯度离心去除上清中细胞和细胞碎片等杂质: 4 $^{\circ}\text{C}$ 条件下300 r/min离心10 min, 将上清液转移至新离心管, 再于4 $^{\circ}\text{C}$ 条件下2 000 r/min离心10 min, 将上清液转移至新离心管, 再于4 $^{\circ}\text{C}$ 、10 000 r/min离心30 min, 将上清液转移至新离心管。按照荧光素酶检测试剂盒(Nano-Glo[®] Luciferase Assay System)说明书, 在离心管中加入与上清样品等体积的荧光素酶检测试剂, 室温下静置3 min, 使用酶标仪检测发光信号。

1.7 细胞基因组提取与聚合酶链式反应(PCR)

待细胞培养至密度为80%时, 吸弃原有培养基, 加入PBS清洗后弃去上清液, 加入胰蛋白酶于室温下消化2~3 min, 显微镜下观察消化完成后, 加入1 mL培养基终止消化, 将细胞悬液转移至1.5 mL离心管中, 室温条件下1 500 r/min离心2 min, 弃去上清液, 加入1 mL PBS重悬细胞沉淀, 室温条件下1 500 r/min再次离心2 min, 弃去上清液, 取200 μL PBS重悬细胞沉淀。之后按照基因组提取试剂盒说明书方法提取细胞基因组, 将溶液转移至新EP管, 加入100 μL DNA洗脱缓冲液, 室温静置2 min, 8 000 r/min离心2 min, -20 $^{\circ}\text{C}$ 条件下保存。

取出细胞基因组样品, 冰上解冻, 在无菌PCR管内按2 \times 快速Taq PCR预混液(Rapid Taq Master Mix)说明书配制PCR反应体系, 添加样品并混匀, 于室温下1 200 r/min离心2 min, 在PCR仪中执行变性、退火、延伸程序: 先95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性3 min; 随后进行30个循环扩增, 依次为95 $^{\circ}\text{C}$ 变性30 s、60 $^{\circ}\text{C}$ 退火30 s、72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸35 s; 循环结束后于72 $^{\circ}\text{C}$ 终延伸5 min, 最后于4 $^{\circ}\text{C}$ 恒温保存。通过琼脂糖凝胶电泳对PCR产物进行特异性验证, 观察是否有目的条带。实验所用的PCR引物均由北京六合华大基因科技有限公司合成, 序列如表1所示。

1.8 细胞RNA提取及实时荧光定量PCR(qRT-PCR)测定

待细胞培养至密度为80%时, 吸弃原有培养基, 加入PBS清洗后弃去清洗液, 加入1 mL TRIzol试剂冰上裂解5 min, 将细胞悬液转移至1.5 mL EP管中并加入200 μL 氯仿, 剧烈振荡15 s后室温静置2~3 min, 4 $^{\circ}\text{C}$ 、12 000 r/min离心15 min, 吸取上层水相至新EP管, 加入500 μL 异丙醇室温静置10 min, 4 $^{\circ}\text{C}$ 、12 000 r/min离心15 min后弃上清, 用1 mL无RNase水稀释的75%乙醇洗涤沉淀, 4 $^{\circ}\text{C}$ 、8 000 r/min离心5 min后弃上清, 室温晾干或真空干燥沉淀5~10 min, 加入30 μL 无RNase水重悬并放置于55 $^{\circ}\text{C}$ 金属浴中15 min, 经NanoDrop One核酸检测仪检测RNA质量和浓度后, 将样品置于-80 $^{\circ}\text{C}$ 超低温冰箱保存。

从-80 $^{\circ}\text{C}$ 超低温冰箱中取出留存的细胞RNA样品, 冰上解冻, 按照qRT-PCR试剂盒说明书方法将RNA逆转录为cDNA。每个样品设置3个复孔, 使用SYBR Green PCR Master Mix进行qRT-PCR反应, 在qRT-PCR仪中运行以下反应程序: 95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性3 min;

随后进行40个循环的扩增反应,每个循环包含95 °C变性12 s,60 °C退火/延伸40 s,并同步完成板孔数值读取。扩增结束后,以0.5 °C的温度梯度增量,从65 °C升温至95 °C,每间隔0.5 °C恒温5 s并采集荧光信号,绘制熔解曲线。将*GAPDH*用作内源性对照,检测*NADB*、*STEAP3*、*SDC-4*的相对表达,用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法进行定量。所用的qRT-PCR引物均由北京六合华大基因科技有限公司合成,序列如表2所示。

1.9 细胞蛋白质提取及蛋白质免疫印迹(Western blot)分析

待细胞培养至密度达70%~80%时,吸弃细胞瓶中培养基,加入PBS清洗并弃去上清液,加入胰蛋白酶室温下消化2~3 min,在显微镜下观察细胞消化完

成后,加入DMEM培养基终止消化,将细胞悬液转移至离心管中,室温下1 500 r/min离心2 min,弃上清,加入1 mL PBS重悬细胞,再次于室温下1 500 r/min离心2 min,弃上清,加入100 μ L含有1%蛋白酶抑制剂的蛋白裂解液进行重悬,冰上静置30 min后于4 °C、12 000 r/min离心5 min,吸取上清液至新离心管中,样品于-80 °C超低温冰箱保存。

用BCA蛋白定量试剂盒测定提取的细胞蛋白样品浓度,根据测定结果按照比例加入细胞蛋白样品、无RNase水和5 \times 蛋白上样缓冲液进行定量,混匀后置于95 °C水浴锅中煮5 min,蛋白质样品变性后,用SDS-PAGE电泳法进行分离,分离后将蛋白质转移到聚偏氟乙烯膜(polyvinylidene fluoride, PVDF)膜上,在

表1 PCR所用的引物序列

Table 1 Primer sequences used for PCR reactions

引物名称 Primer name	序列(5'→3') Sequence (5'→3')
loxP-left-F1	TGT TCT CCT CTT CCT CAT CTC C
loxP-left-R1	GTT CTT GCA GCT CGG TGA C
loxP-right-F1	GCC TTC TAT CGC CTT CTT GAC
loxP-right-R1	CGG CAC TCG TTA ACT GAC AG
SDC-4-NADB-F	CCA CCG CAG GTA TAA TGT GC
SDC-4-NADB-R	CCT GGG CAA GAA ACC CAT CT
STEAP3-SDC-4-F	TGT TTC TCC TGC CCT GCA TC
STEAP3-SDC-4-R	GAG CAC CAT CAA GTT CAC GC
NADB-F	ATA TCA GCC ATA AGC CCG CC
NADB-R	CGG TAC CGG TTC TTG TGT GA
STEAP3-F	CTG GAG GGA GTT CAG CTT CG
STEAP3-R	CTG ATG CAG GGC AGG AGA AA
SDC-4-F1	GGA GCC CTA CCA GAC GAT GA
SDC-4-R1	CCA CCC ACA ATC AGA GCT GC
GAPDH-exon-F	ACC ACA GTC CAT GCC ATC AC
GAPDH-exon-R	CCA CCT GGT GCT CAG TGT AG

表2 qRT-PCR所用的引物序列

Table 2 Primer sequences used for qRT-PCR reactions

引物名称 Primer name	序列(5'→3') Sequence (5'→3')
NADB-F	ATA TCA GCC ATA AGC CCG CC
NADB-R	CGG TAC CGG TTC TTG TGT GA
STEAP3-F	CTG GAG GGA GTT CAG CTT CG
STEAP3-R	CTG ATG CAG GGC AGG AGA AA
SDC-4-F1	GGA GCC CTA CCA GAC GAT GA
SDC-4-R1	CCA CCC ACA ATC AGA GCT GC
Q-GAPDH-F	AGG TTG TCT CCT GCG ACT TCA
Q-GAPDH-R	GTC CAG GGT GGG CTT CTT ACT

室温下用5%脱脂奶粉封闭1 h,用TSG101(1:1 000稀释)、Alix(1:1 000稀释)、Calnexin(1:10 000稀释)抗体分别于室温下孵育1 h或4 °C孵育过夜,用二抗用辣根过氧化物酶(HRP)标记的山羊抗鼠(1:3 000稀释)或山羊抗兔二抗(1:3 000稀释)室温孵育1 h。用增强化学发光(enhanced chemiluminescence, ECL)试剂检测蛋白质免疫印迹条带,拍摄可视化蛋白质条带的照片。

1.10 EdU细胞掺入实验检测细胞增殖情况

将细胞以相同数量(每孔 3×10^4 个细胞)接种于4孔小室,待细胞贴壁生长至状态稳定时,将5-乙炔基-2'-脱氧尿苷(5-ethynyl-2'-deoxyuridine, EdU)原液用细胞培养液1:500稀释,配制得到 $2 \times$ EdU工作液,37 °C预热后将 $2 \times$ EdU工作液与细胞培养液等体积加入小室,37 °C培养箱内孵育细胞2 h,待EdU标记完成后,按照EdU检测试剂盒说明书处理细胞。在共聚焦显微镜下观察拍照并进行细胞计数,定量EdU阳性增殖细胞在全部细胞中的占比。

1.11 流式细胞术检测细胞凋亡情况

取生长状态稳定的整合外泌体促进器的单克隆细胞株与CHO-K1细胞株,PBS清洗后用胰蛋白酶在室温下消化2~3 min,用含10%胎牛血清的DMEM培养基终止消化,将细胞轻柔吹打混匀制成单细胞悬液,取1 mL细胞悬液进行离心,室温条件下1 500 r/min离心2 min后弃上清,按照细胞凋亡检测试剂盒说明书,加入100 μ L预冷的结合缓冲液重悬,之后加入5 μ L Annexin V-FITC与5 μ L PI,室温条件下避光孵育15 min;孵育完成后加入500 μ L预冷PBS进行稀释,然后用流式细胞仪检测,每个样本检测 1×10^4 个细胞,以CHO-K1为对照设定阴性阈值,调节仪器电压使目的细胞群处于最佳检测窗口,FlowJo软件分析凋亡比例,圈选目的细胞群后计算阳性细胞占比,每组细胞设置3个生物学重复,并设置空白组与单染组对照以调节仪器荧光补偿,确保数据结果稳定可靠。

1.12 外泌体制备

当细胞生长至密度达80%~90%时,吸弃原有培养液,用PBS缓冲液洗涤细胞2次,加入无血清DMEM培养基于37 °C、5% CO₂的细胞培养箱中孵育48 h,收集上清液至离心管中,进行梯度离心去除细胞碎片、杂蛋白等:4 °C条件下300 r/min离心10 min,将上清液转移至新离心管中,再于4 °C条件下2 000 r/min离心10 min,将上清液转移至新离心管中,再于4 °C

条件下10 000 r/min离心30 min,收集上清液并转移至新离心管,可在-80 °C超低温冰箱保存或立即进行超速离心。

将上清液转移至超速离心管中,使用电子天平称重,使用超速离心机4 °C条件下100 000 r/min离心1.5 h,弃上清,每50 mL初始上清对应的外泌体沉淀加入100 μ L PBS重悬,将收集到的外泌体溶液储存在-80 °C条件下或立即用于实验。

1.13 外泌体表征检测

1.13.1 纳米粒子追踪分析 采用纳米粒子追踪分析系统(nanoparticle tracking analysis, NTA)对分离的外泌体进行浓度与粒径分布表征。将收集的外泌体样品使用PBS缓冲液(0.22 μ m滤膜过滤)进行稀释(稀释100倍),将稀释后的样品注入样品池,待激光光路稳定后开始采集数据。每个样品随机选择3个不同视野,每个视野录制60 s。剔除样品池边缘及气泡干扰的帧,通过NTA 3.4软件自带算法自动分析颗粒的布朗运动轨迹,计算并拟合得到外泌体的颗粒数及粒径分布曲线。

1.13.2 透射电子显微镜形态学观察 采用负染色法结合TEM观察外泌体的形态特征。取5 μ L颗粒数 $\geq 1 \times 10^{10}$ /mL的外泌体悬液,滴加至等离子体清洗后的200目碳膜铜网,室温孵育5 min,滤纸吸去多余液体后,滴加5 μ L 2%磷钨酸(pH6.8)避光染色2 min,吸去染液待铜网干燥后置于TEM中,80 kV电压下观察,随机选取视野拍摄照片。

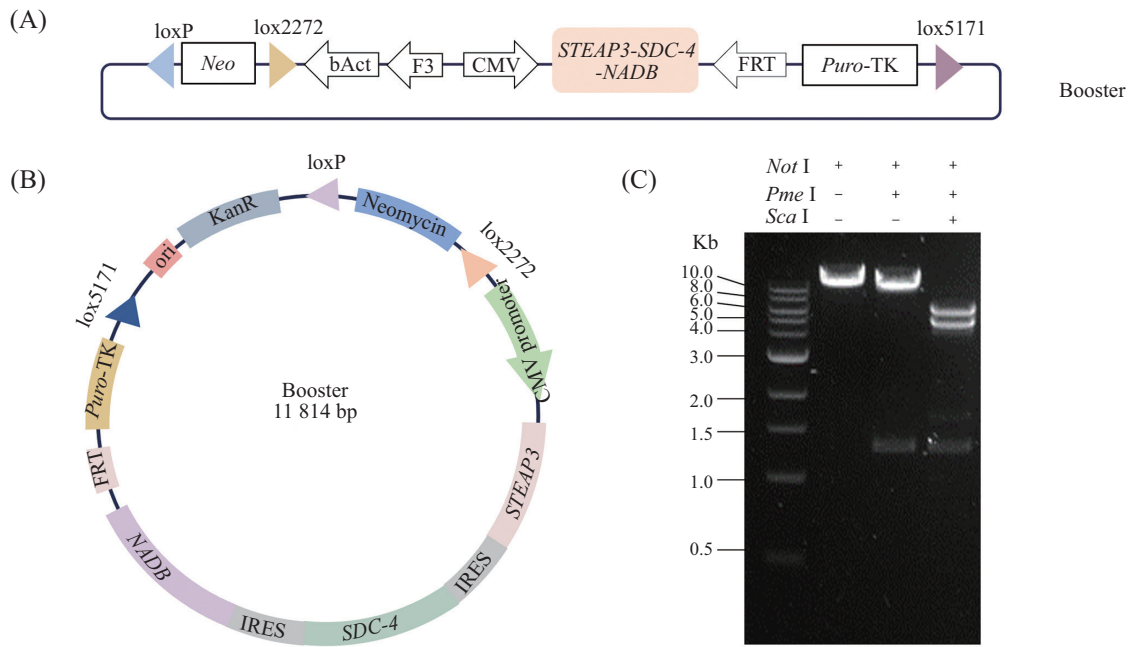
1.14 统计分析

用GraphPad Prism软件进行数据处理并作图,所有数据均以均值 \pm 标准误(mean \pm SEM)表示。每个独立实验均重复3次或以上,使用单因素方差分析进行多组独立样本间的对比。 $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 外泌体促进器质粒的构建与鉴定

为实现外泌体的高效分泌,我们根据“着陆架”基因序列中的左、右基因置换位点(loxP、lox5171)设计左、右同源臂基因序列,构建了带有3个外泌体促进基因——*NADB*^[28]、*STEAP3*^[29]和*SDC-4*^[30],新霉素抗性筛选标记(*Neo*)及RMCE识别元件的外泌体促进器质粒booster(图1A和图1B)。使用前利用限制性内切酶*Not* I、*Pme* I及*Sca* I对该质粒进行



A、B: 外泌体促进器质粒booster的结构示意图。C: 酶切鉴定。采用限制性内切酶酶切验证质粒构建是否正确, 1%琼脂糖凝胶电泳显示出预期大小的目的条带。

A,B: schematic diagram of the exosome booster plasmid. C: restriction enzyme digestion identification. Restriction enzyme digestion was used to verify the correctness of vector construction, and 1% agarose gel electrophoresis showed the target band with the expected size.

图1 外泌体促进器质粒的构建与鉴定

Fig.1 Construction and identification of exosome booster plasmids

酶切鉴定, 经1%琼脂糖凝胶电泳鉴定, 酶切电泳条带的大小及相对位置与预期结果完全吻合(图1C), 证实目的基因已准确插入载体, 外泌体促进器质粒构建成功。

2.2 整合外泌体促进器的工程细胞株构建

为获得定点整合外泌体促进器的细胞株, 在CHO-K1-LP细胞的基础上, 我们利用RMCE技术将携带 *NADB*、*STEAP3*和*SDC-4*的外泌体促进器基因booster定点整合至着陆架基因位点(图2A)。随后采用携带GFP荧光标记的Cre重组酶腺病毒感染细胞, 24 h后通过荧光倒置显微镜评估感染效率。镜下观察结果如图2B所示, Cre重组酶成功在CHO-K1-LP细胞中表达, 绿色荧光蛋白表达率约为70%(图2B)。随后通过FuGENE® HD将booster质粒转染入细胞中, 并进行单克隆细胞株的筛选与鉴定。

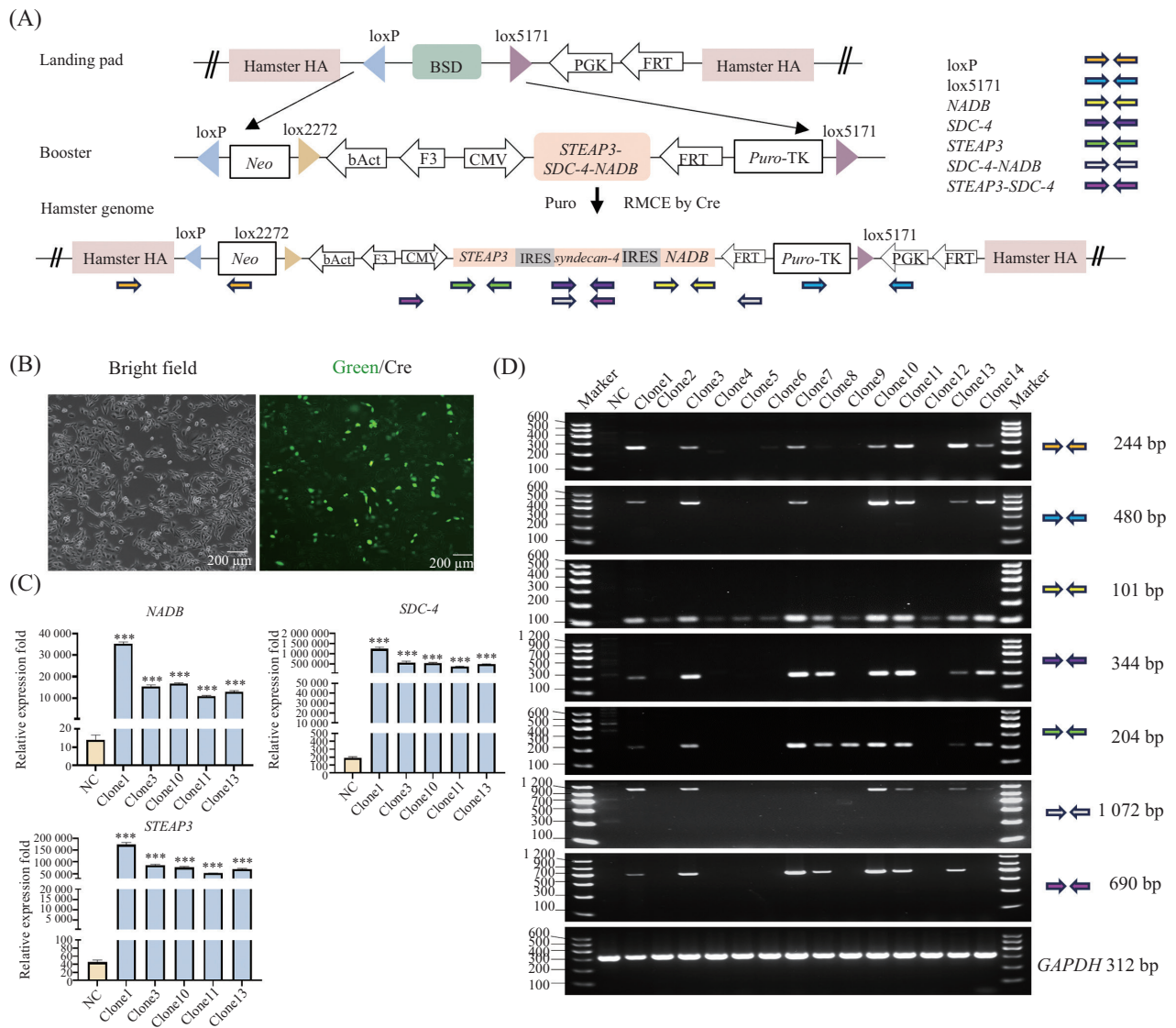
基因组检测结果显示, 筛选出的1、3、10、11和13号单克隆细胞株在基因组水平上均呈现出与预期一致的正确扩增带型, 证实这些单克隆细胞株已经成功实现外泌体促进器序列的稳定定点整合(图2D)。转录组检测结果显示, 以CHO-K1细胞为基准, 外泌体促进器单克隆细胞株(clone1、clone3、

clone10、clone11和clone13)均实现了外泌体促进器基因的稳定转录(图2C)。这表明定点整合的外泌体促进基因具有良好的遗传稳定性。

2.3 工程化外泌体改造对CHO-K1细胞生物学功能无影响

为评估工程化改造外泌体促进器对CHO-K1细胞功能的影响, 我们首先采用EdU摄入实验检测细胞增殖活性。EdU荧光染色结果显示, 各组细胞EdU阳性信号(红色荧光)在细胞核内呈均匀分布, 未观察到凋亡小体形成或核碎裂等形态异常, 且两组细胞的生长密度与形态表现一致, 实验组未见异常增殖灶(图3A), 各组间EdU阳性细胞比例无显著性差异($P>0.05$)(图3C)。上述结果表明, 工程化CHO-K1细胞株在实现外泌体高效分泌的同时, 较好地维持了原有的细胞生长特性, 外泌体促进器的引入对宿主细胞的增殖功能无显著影响。

之后使用流式细胞术检测细胞凋亡情况。检测结果显示, 各实验组与对照组的总凋亡细胞比例(早期凋亡细胞Annexin V⁺/PI⁻与晚期凋亡细胞Annexin V⁺/PI⁺之和)均维持在5%以内(图3B), 组间差异无统计学意义($P>0.05$, 图3D)。此外, 实验组未观察到早



A: RMCE介导的loxP/lox5171位点替换, 用于导入质粒booster。B: 明场(左)与GFP荧光(右)图像, 多视野计数统计显示腺病毒介导Cre重组酶的细胞感染效率约为70%。C: qRT-PCR验证外泌体促进基因*NADB*、*STEAP3*和*SDC-4*的mRNA表达水平。D: booster基因定点整合的PCR鉴定。单克隆细胞株1、3、10、11、13可见特异性条带, NC组未检测到条带。n=3, ***P<0.001。

A: RMCE-mediated loxP/lox5171 locus replacement for introducing the exosome booster vector booster. B: bright field (left) and GFP fluorescence (right) images. Statistical analysis based on counting multiple fields of view showed that the infection efficiency of adenovirus-mediated Cre recombinase was approximately 70%. C: quantitative real-time PCR verification of the mRNA expression levels of exosome-promoting genes *NADB*, *STEAP3*, and *SDC-4*. D: PCR identification of site-specific integration of the booster gene. Specific bands were observed in monoclonal cell lines 1, 3, 10, 11, and 13, while no band was detected in the CHO-K1 group (NC). n=3, ***P<0.001.

图2 高产外泌体的工程化细胞株的构建

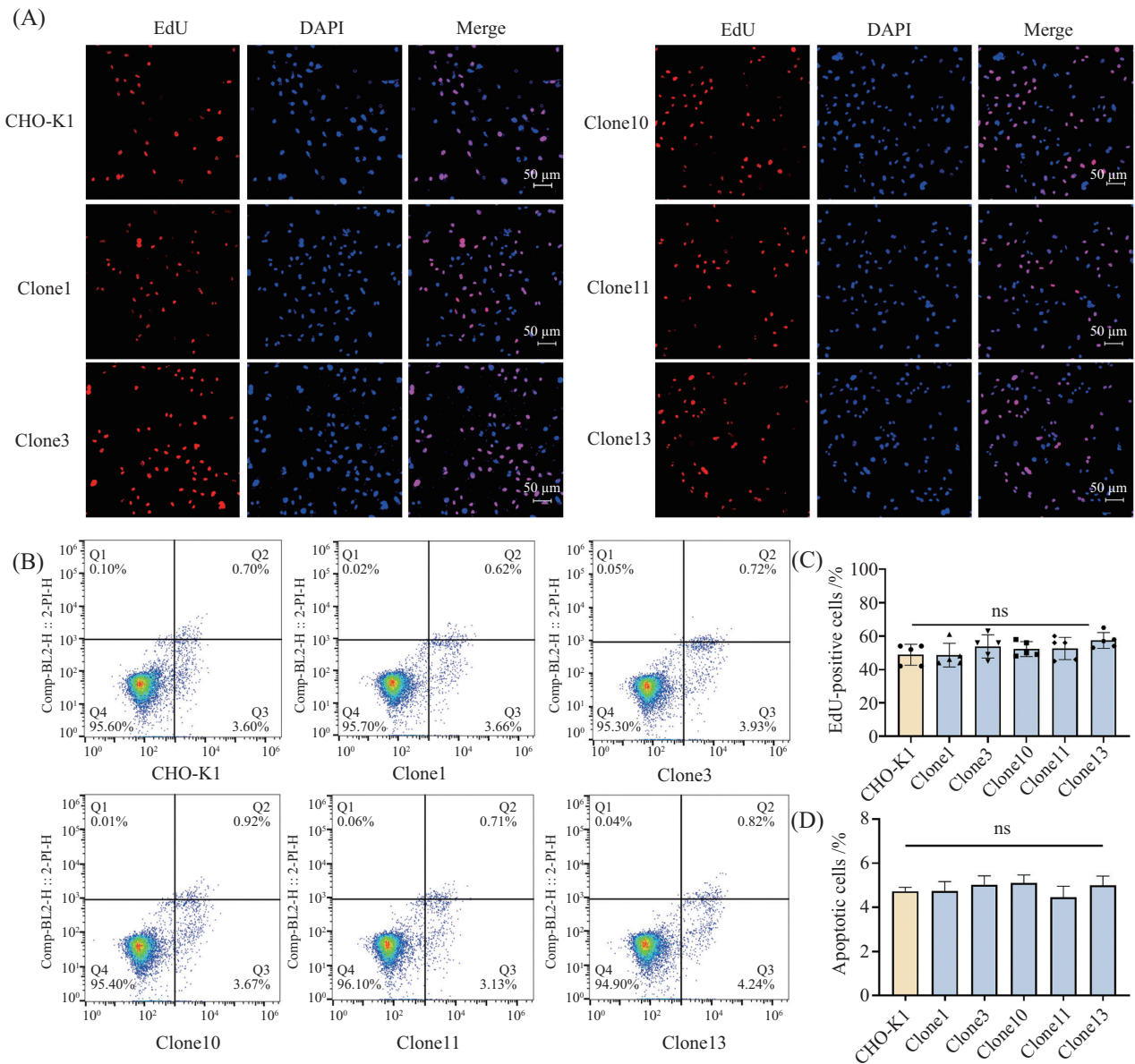
Fig.2 Construction of an engineered cell line for enhanced exosome secretion

期凋亡比例升高或晚期凋亡/坏死细胞累积的现象, 表明工程化改造未诱导细胞凋亡通路的激活。

2.4 外泌体促进器可显著提升CHO-K1细胞外泌体分泌效率

为探究外泌体促进器对细胞外泌体分泌量的影响, 我们选取了外泌体表面标志蛋白CD63作为示踪靶标, 将其与纳米荧光素 (NanoLuc, Nluc) 进行融

合表达, 构建了针对外泌体表面膜蛋白CD63的荧光报告质粒——CD63-Nluc(图4A)。使用限制性内切酶*Bam*H I、*Xba* I对质粒进行双酶切, 酶切产物通过1%琼脂糖凝胶电泳分析鉴定, 酶切电泳条带的大小及相对位置与预期结果完全吻合(图4B), 证实目的基因已准确插入载体, CD63-Nluc荧光报告质粒构建成功。我们将其转入外泌体促进器单克隆细胞



A: EdU掺入实验检测细胞增殖活性。荧光图像显示EdU阳性信号: 红色在细胞核中均匀分布, 无凋亡或异常增殖。B: 流式细胞术检测细胞凋亡。C: EdU掺入实验结果直方图。D: 流式细胞术检测结果直方图, $n=3$ 。 $^{ns}P>0.05$ 。

A: EdU incorporation assay for detecting cell proliferation activity. Fluorescence images showed uniform distribution of EdU-positive signals (red) in the cell nucleus, with no apoptosis or abnormal proliferation. B: flow cytometry for detecting cell apoptosis. C: histogram of EdU incorporation assay results. D: histogram of flow cytometry detection results, $n=3$. $^{ns}P>0.05$.

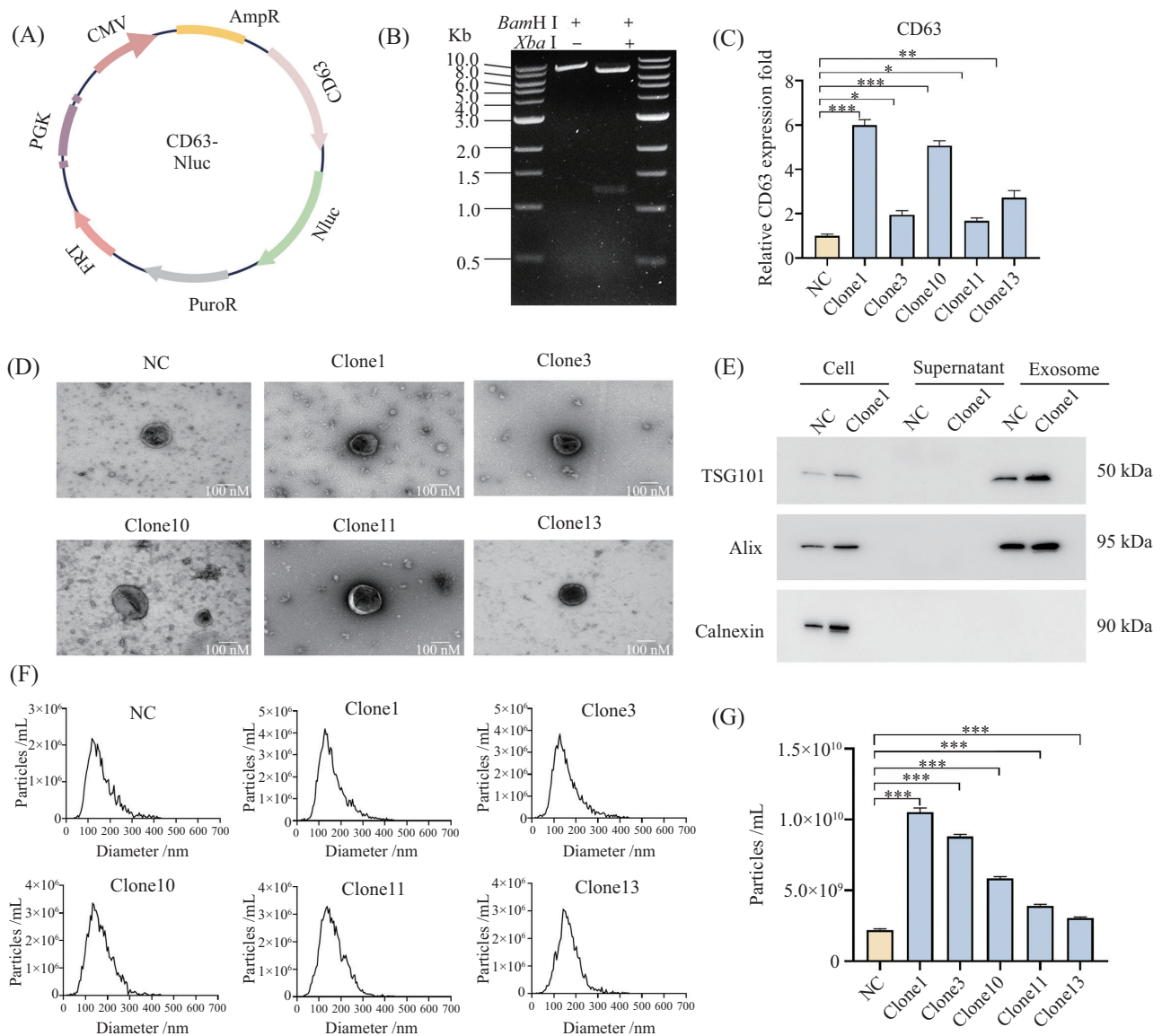
图3 高产外泌体细胞株的功能检测

Fig.3 Functional detection of cell lines for enhanced exosome secretion

($n=3$)中, 荧光素酶报告实验检测结果显示, 与对照组相比, 整合了外泌体促进器的单克隆细胞上清中的荧光信号均有提升, clone1细胞株的发光强度最高, 表明clone1外泌体分泌的效率最高(图4C)。

为进一步验证外泌体促进器的作用效能, 我们通过超速离心法从细胞上清中提取外泌体, TEM观察结果显示, 外泌体促进器单克隆细胞株所分泌的外泌体整体形态规整、结构完整, 均呈现出典型的

外泌体超微结构特征, 具有清晰可辨的双层膜结构, 膜边界光滑、连续, 无明显破损或形态异常, 符合外泌体形态学标准(图4D)。之后通过蛋白质免疫印迹实验对其表面标志蛋白TSG101、Alix及外泌体的阴性标志物Calnexin进行鉴定。结果显示, 外泌体中TSG101与Alix均呈阳性表达, 条带单一且分子量符合预期, 而外泌体的阴性标志物Calnexin未见表达(图4E)。上述结果表明, 外泌体促进器的工程化改



A: CD63-Nluc荧光报告质粒示意图。B: CD63-Nluc荧光报告质粒的酶切鉴定。C: 荧光素酶报告实验检测CD63-Nluc标记外泌体的分泌效率。实验组clone1的发光信号强度显著高于对照组。D: TEM图像。外泌体呈现典型双层膜结构, 直径约100 nm。E: 蛋白质免疫印迹分析验证外泌体表面标志物蛋白的表达情况。实验组TSG101和Alix呈阳性, 外泌体中阴性对照Calnexin未被检测到。F: NTA检测外泌体粒径分布与颗粒数量。各组外泌体粒径分布为30~150 nm。G: NTA检测结果直方图。 $n=3$, $*P<0.05$, $**P<0.001$, $***P<0.001$ 。

A: schematic diagram of the CD63-Nluc fluorescent reporter plasmid. B: restriction enzyme digestion identification of the CD63-Nluc fluorescent reporter plasmid. C: Nano-Glo[®] luciferase reporter assay for detecting the secretion efficiency of CD63-Nluc-labeled exosomes. The luminescent signal intensity of the experimental group (clone1) was significantly higher than that of the control group. D: TEM (transmission electron microscopy) images. Exosomes exhibited a typical bilayer membrane structure with a diameter of approximately 100 nm. E: Western blot verification of exosome surface marker protein expression. TSG101 and Alix were positive in the experimental group, while Calnexin (negative control) was not detected in exosomal samples. F: NTA (nanoparticle tracking analysis) for detecting exosome size distribution and particle number. The exosome size distribution in each group was 30-150 nm. G: histogram of NTA detection results. $n=3$, $*P<0.05$, $**P<0.01$, $***P<0.001$.

图4 工程化细胞株可实现外泌体的高效分泌

Fig.4 High-efficiency exosome secretion by engineered cell lines

造未对CHO-K1细胞外泌体的基本表征及结构特性产生显著影响。

为进一步验证外泌体促进器整合对细胞外泌体分泌水平的影响, 我们使用提取的上清外泌体进

行NTA检测, 检测结果显示, 各组细胞分泌的外泌体粒径均处于30~150 nm的预期范围内(图4F), 符合外泌体的典型物理表征。随后, 通过NTA对各组外泌体的颗粒数进行定量分析, 结果与荧光素酶报告实

验检测趋势高度一致: clone1组的外泌体颗粒数最高(图4G),证实CHO-K1-LP-B-clone1细胞的外泌体分泌效率最高。

综上,我们成功获得能够高效分泌外泌体的工程化细胞株——clone1,且外泌体促进器介导的工程化改造对CHO-K1细胞及其来源外泌体的表征及大小、结构等核心生物学特性均无显著影响。

3 讨论

外泌体作为细胞分泌的天然纳米级膜囊泡,凭借其高生物相容性、低免疫原性及跨越生理屏障的能力,已成为生物学领域极具潜力的药物递送载体,在肿瘤、代谢性疾病及神经系统疾病的精准治疗中展现出广阔的应用前景^[31-32]。然而,天然细胞分泌的外泌体产量极低,且传统的工程化改造多采用随机整合方式,存在整合位点不可控、外源基因表达不稳定及易引发插入突变等缺陷,严重制约了其临床转化进程^[33-37]。

基于此,我们通过RMCE技术,将含*NADB*、*STEAP3*、*SDC-4*的外泌体促进器基因booster定点整合至CHO-K1-LP细胞基因组,获得了稳定表达这3个外泌体促进基因的工程化细胞株。基因组PCR结果证实,外泌体促进器已精准整合至目标位点,qRT-PCR结果显示,*NADB*、*STEAP3*、*SDC-4*在单克隆细胞中的表达量较亲本细胞提升万倍以上。基因组与转录组水平的检测证实,上述“外泌体促进器”基因已在CHO-K1-LP细胞中实现定点整合与高效表达,其中单克隆株clone1的表达效率最高。

传统的工程化外泌体高产改造往往会给细胞带来过重的代谢负担,引发增殖抑制甚至细胞凋亡的风险^[38-39]。在本研究中,我们利用RMCE技术和CHO-K1细胞高效表达外源基因的能力,使外泌体促进器基因在细胞内高表达的同时也避免了外源基因过度表达导致的细胞毒性效应。EdU细胞增殖实验与流式凋亡检测结果表明,工程化改造未对CHO-K1细胞的生长特性产生负面影响,验证了该策略的安全性及稳定性,为长期、稳定、规模化生产外泌体提供了可靠保障^[40-41]。这一点与KRETZ等^[42]报道的CHO工程细胞耐受性增强现象高度吻合,进一步证明了基于CHO细胞的大规模、可持续性外泌体生产的可行性与优势。同时我们使用的RMCE技术具有高度通用性:通过替换loxP/FRT等基因置换元

件,可灵活引入其他外泌体调控因子(如Rab GTP酶、nSmase2等)或负载治疗性分子(如siRNA、CRISPR元件),从而定制功能化外泌体^[43-44]。

随后通过荧光素酶报告实验、TEM、NTA、Western blot等多种方法对改造后细胞的外泌体分泌效率与特性进行系统表征。以CD63-Nluc荧光报告质粒作为定量探针评估外泌体促进器在细胞功能层面上对实际外泌体分泌量的提升效果,结果显示,工程化细胞外泌体分泌信号显著高于亲本细胞;NTA结果证实,外泌体粒径集中在30~150 nm,符合典型外泌体物理特征,且颗粒浓度显著提升,其中单克隆株clone1的外泌体分泌效率最高;TEM观察显示外泌体形态完整、膜结构清晰;Western blot检测到TSG101、Alix等外泌体标志性蛋白高表达,阴性对照蛋白Calnexin无明显表达,证明所获囊泡为纯净、结构完整的外泌体。上述结果充分证明,工程化细胞株的外泌体分泌效率较亲本细胞显著提升,且其膜结构完整,粒径分布(30~150 nm)与理化特性均与天然外泌体保持一致,具备了作为优良药物递送载体的先决条件,成功突破了天然外泌体产量低的行业瓶颈,为后续载药外泌体生产奠定了坚实基础。

综上所述,我们利用RMCE技术构建了CHO-K1工程化外泌体生产系统,该系统通过*NADB*、*STEAP3*、*SDC-4*基因的协同表达显著提升了细胞外泌体的分泌效率,有效解决了外泌体工业化生产中的产量瓶颈与功能化修饰难题,为外泌体规模化生产奠定了基础,具备良好的产业转化潜力。此外,高产外泌体的工具细胞株可继续依托RMCE技术,高效装载多种治疗性分子,包括小分子药物、干扰素、细胞因子、抗体片段、siRNA及miRNA等,从而将靶向递送与精准治疗应用拓展至糖尿病、肥胖、非酒精性脂肪性肝炎、肿瘤及炎症性疾病等多种领域。

作者贡献

王如萍负责方案设计、实验操作、初稿写作;漫未玲负责数据管理、方案设计、稿件润色修改;王丽娟负责数据管理、实验设计;李响负责材料支持;朱天昊负责实验操作;何盈盈负责实验操作、稿件润色;林艳丽、吴晓洁负责监督指导、稿件修改;崔雨萌、黎扬华负责实验指导、数据收集;庞芳、李莹、马岳负责实验指导、数据整理;周成江、王友亮负责方案设计、实验指导、数据管理、经费支持、稿件润色修改。

参考文献 (References)

- [1] FAMILTSEVA A, JEREMIC N, TYAGI S C. Exosomes: cell-created drug delivery systems [J]. *Mol Cell Biochem*, 2019, 459(1/2): 1-6.
- [2] LIANG Y J, DUAN L, LU J P, et al. Engineering exosomes for targeted drug delivery [J]. *Theranostics*, 2021, 11(7): 3183-95.
- [3] BATRAKOVA E V, KIM M S. Using exosomes, naturally-equipped nanocarriers, for drug delivery [J]. *J Control Release*, 2015, 219: 396-405.
- [4] HAN L, ZHAO Z R, HE C S, et al. Removing the stumbling block of exosome applications in clinical and translational medicine: expand production and improve accuracy [J]. *Stem Cell Res Ther*, 2023, 14(1): 57.
- [5] KIMIZ-GEBOGLU I, ONCEL S S. Exosomes: large-scale production, isolation, drug loading efficiency, and biodistribution and uptake [J]. *J Control Release*, 2022, 347: 533-43.
- [6] JAFARI D, MALIH S, EINI M, et al. Improvement, scaling-up, and downstream analysis of exosome production [J]. *Crit Rev Biotechnol*, 2020, 40(8): 1098-112.
- [7] TIAN J Q, HAN Z P, SONG D D, et al. Engineered exosome for drug delivery: recent development and clinical applications [J]. *Int J Nanomedicine*, 2023, 18: 7923-40.
- [8] HE J, REN W H, WANG W, et al. Exosomal targeting and its potential clinical application [J]. *Drug Deliv Transl Res*, 2022, 12(10): 2385-402.
- [9] FU P W, YIN S Q, CHENG H Y, et al. Engineered exosomes for drug delivery in cancer therapy: a promising approach and application [J]. *Curr Drug Deliv*, 2024, 21(6): 817-27.
- [10] GHANBARI S, BAYAT E, AZIZI M, et al. Targeted integration in CHO cells using CRIS-PITCh/Bxb1 recombinase-mediated cassette exchange hybrid system [J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2023, 107(2/3): 769-83.
- [11] KOLB A F, KNOWLES C, PULTINEVICIUS P, et al. Recombinase-mediated cassette exchange using adenoviral vectors [J]. *Methods Mol Biol*, 2017, 1642: 127-50.
- [12] TURAN S, ZEHE C, KUEHLE J, et al. Recombinase-mediated cassette exchange (RMCE): a rapidly-expanding toolbox for targeted genomic modifications [J]. *Gene*, 2013, 515(1): 1-27.
- [13] FISCHER S, HANDRICK R, OTTE K. The art of CHO cell engineering: a comprehensive retrospect and future perspectives [J]. *Biotechnol Adv*, 2015, 33(8): 1878-96.
- [14] CHI X L, ZHENG Q, JIANG R, H et al. A system for site-specific integration of transgenes in mammalian cells [J]. *PLoS One*, 2019, 14(7): e0219842.
- [15] KEYSBERG C, HERTEL O, SCHELLETTER L, et al. Exploring the molecular content of CHO exosomes during bioprocessing [J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2021, 105(9): 3673-89.
- [16] LEHMKUHL M, KEYSBERG C, OTTE K, et al. Separation and purification of CHO secretome and extracellular vesicles for proteome analysis [J]. *Methods Mol Biol*, 2025, 2853: 155-71.
- [17] 李仙红, 贾润清, 王友亮, 等. 定点整合 β 1,4半乳糖基转移酶、 α -2,6-唾液酸转移酶I和N-乙酰氨基糖基转移酶III的CHO工程细胞株构建[J]. *中国生物化学与分子生物学报* (LI X H, JIA R R, WANG Y L, et al. Engineer CHO cell lines to stably express B4GALT1, ST6GAL1, and GnTIII with site-directed integration [J]. *Chinese Journal of Biochemistry and Molecular Biology*), 2025, 41(4): 576-85.
- [18] KOJIMA R, BOJAR D, RIZZI G, et al. Designer exosomes produced by implanted cells intracerebrally deliver therapeutic cargo for Parkinson's disease treatment [J]. *Nat Commun*, 2018, 9(1): 1305.
- [19] COVARRUBIAS A J, PERRONE R, GROZIO A, et al. NAD⁺ metabolism and its roles in cellular processes during ageing [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2021, 22(2): 119-41.
- [20] ZAPATA-PÉREZ R, WANDERS R J A, VAN KARNEBEEK C D M, et al. NAD⁺ homeostasis in human health and disease [J]. *EMBO Mol Med*, 2021, 13(7): e13943.
- [21] REN C F, ZHANG S, CHEN Y Y, et al. Exploring nicotinamide adenine dinucleotide precursors across biosynthesis pathways: unraveling their role in the ovary [J]. *FASEB J*, 2024, 38(14): e23804.
- [22] HOWIE H L, HAY A M, DE WOLSKI K, et al. Differences in Steap3 expression are a mechanism of genetic variation of RBC storage and oxidative damage in mice [J]. *Blood Adv*, 2019, 3(15): 2272-85.
- [23] SHI H Q, LEI S Y, XIONG L, et al. Molecular characterization of STEAP3 in lung squamous cell carcinoma: regulating EGFR to affect cell proliferation and ferroptosis [J]. *Arch Biochem Biophys*, 2024, 751: 109842.
- [24] WANG L L, LUO J, HE Z H, et al. STEAP3 promotes cancer cell proliferation by facilitating nuclear trafficking of EGFR to enhance RAC1-ERK-STAT3 signaling in hepatocellular carcinoma [J]. *Cell Death Dis*, 2021, 12(11): 1052.
- [25] ONYEISI J O S, LOPES C C, GÖTTE M. Syndecan-4 as a pathogenesis factor and therapeutic target in cancer [J]. *Biomolecules*, 2021, 11(4): 503.
- [26] SIMONS M, HOROWITZ A. Syndecan-4-mediated signalling [J]. *Cell Signal*, 2001, 13(12): 855-62.
- [27] VAN DEN BERG B M. Syndecan-4, a model proteoglycan to study endothelial glycocalyx mechanosensing and signal transduction [J]. *Acta Physiol*, 2020, 228(3): e13410.
- [28] LI Y X, OGOLA H J, SAWA Y. L-aspartate dehydrogenase: features and applications [J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2012, 93(2): 503-16.
- [29] WU L L, TIAN X, ZUO H W, et al. miR-124-3p delivered by exosomes from heme oxygenase-1 modified bone marrow mesenchymal stem cells inhibits ferroptosis to attenuate ischemia-reperfusion injury in steatotic grafts [J]. *J Nanobiotechnology*, 2022, 20(1): 196.
- [30] GHOSOUB R, CHÉRY M, AUDEBERT S, et al. Tetraspanin-6 negatively regulates exosome production [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2020, 117(11): 5913-22.
- [31] FATMA Z, TAN S I, BOOB A G, et al. A landing pad system for multicopy gene integration in *Issatchenia orientalis* [J]. *Metab Eng*, 2023, 78: 200-8.
- [32] BROSH R, LAURENT J M, ORDOÑEZ R, et al. A versatile platform for locus-scale genome rewriting and verification [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2021, 118(10): e2023952118.
- [33] SHIN S, KIM S H, LEE J S, et al. Streamlined human cell-based recombinase-mediated cassette exchange platform enables multigene expression for the production of therapeutic proteins [J]. *ACS Synth Biol*, 2021, 10(7): 1715-27.

- [34] QUADROS R M, HARMS D W, OHTSUKA M, et al. Insertion of sequences at the original provirus integration site of mouse ROSA26 locus using the CRISPR/Cas9 system [J]. *FEBS Open Bio*, 2015, 5: 191-7.
- [35] PHAN Q V, CONTZEN J, SEEMANN P, et al. Site-specific chromosomal gene insertion: Flp recombinase versus Cas9 nuclease [J]. *Sci Rep*, 2017, 7(1): 17771.
- [36] DE MAGALHÃES J P. Cellular senescence in normal physiology [J]. *Science*, 2024, 384(6702): 1300-1.
- [37] ZHANG C, CHANG F, MIAO H, et al. Construction and application of a multifunctional CHO cell platform utilizing Cre/lox and Dre/rox site-specific recombination systems [J]. *Front Bioeng Biotechnol*, 2023, 11: 1320841.
- [38] RÄDLER J, GUPTA D, ZICKLER A, et al. Exploiting the biogenesis of extracellular vesicles for bioengineering and therapeutic cargo loading [J]. *Mol Ther*, 2023, 31(5): 1231-50.
- [39] ZHANG M, WAN L, LI R Q, et al. Engineered exosomes for tissue regeneration: from biouptake, functionalization and biosafety to applications [J]. *Biomater Sci*, 2023, 11(22): 7247-67.
- [40] PRISTOVŠEK N, NALLAPAREDDY S, GRAV L M, et al. Systematic evaluation of site-specific recombinant gene expression for programmable mammalian cell engineering [J]. *ACS Synth Biol*, 2019, 8(4): 758-74.
- [41] GAIDUKOV L, WROBLEWSKA L, TEAGUE B, et al. A multi-landing pad DNA integration platform for mammalian cell engineering [J]. *Nucleic Acids Res*, 2018, 46(8): 4072-86.
- [42] KRETZ R, WALTER L, RAAB N, et al. Spatial proteomics reveals differences in the cellular architecture of antibody-producing CHO and plasma cell-derived cells [J]. *Mol Cell Proteomics*, 2022, 21(10): 100278.
- [43] YUM S Y, CHOI W, KIM S, et al. Identification AAVS1-like locus from the porcine genome and site-specific integration of recombinase-mediated cassette exchange using CRISPR/Cas9 [J]. *Anim Biotechnol*, 2023, 34(9): 4730-5.
- [44] HE Y Y, CUI Y M, WANG L J, et al. Extracellular vesicles for delivery of functional telomerase [J]. *Cell Commun Signal*, 2025, 23(1): 509.