

工程化外泌体通过m⁶A调控的RPL19 mRNA稳定性实现恶性肿瘤精准基因治疗

李艳^{1,2,3,4†}, 罗冰洁^{5†}, 陈穗芳^{6†}, 楚晓东³, 邹嘉仪⁶, 李玲玉^{5,7}, 张玉玲³, 林丽珠^{1,8*}, 张荣华^{9,10*}, 王攀攀^{4*}

1. 广州中医药大学第一附属医院, 广州 510405
2. 广州中医药大学博士后科研流动站, 广州 510405
3. 暨南大学肿瘤研究所, 广州 510630
4. 暨南大学第一附属医院, 广州 510630
5. 暨南大学药学院, 广州 510630
6. 广州中医药大学第一临床医学院, 广州 510405
7. 广东省中医药信息化重点实验室, 广州 510630
8. 广东省中医临床研究院, 广州 510006
9. 暨南大学中医学院, 广州 510630
10. 暨南大学中医药与健康研究院, 广州 510630

† 同等贡献

* 联系人, E-mail: gzuclmlnz@163.com; tzrh@jnu.edu.cn; wangpp@jnu.edu.cn

2025-12-02 收稿, 2026-01-23 修回, 2026-04-08 接受, 2026-04-10 网络版发表

国家自然科学基金(81603342, 82574761)、国家中医药传承创新中心重点病种(09005651020)、中国博士后科学基金(2025M783962)、广东省基础与应用基础研究基金(2022A1515012641, 2022B1515230003, 2024A1515012948)、广州市科技计划(2024A03J0154, 2023B01J1004, 2023A03J0617, 2025A03J3478)、暨南大学附属第一医院临床前沿新技术项目(JNU1AF-CFTP-2022-a01232)、生物活性分子与成药性优化国家重点实验室开放课题、广东特支计划领军人才项目(0720240115)和中国中医药联合研究生院科教专项(CI2023C030LH)资助

摘要 RNA表观遗传修饰是调控基因表达的重要机制, 其中N⁶-甲基腺苷(N⁶-methyladenosine, m⁶A)是最常见且最具研究价值的修饰类型之一. m⁶A修饰可影响RNA的稳定性、翻译效率及降解过程, 其异常调控已被证实与多种恶性肿瘤的发生发展密切相关. 然而, 受制于递送系统选择性不足及全身毒性风险, 目前实现对RNA甲基化的精准调控仍存在显著挑战. 针对上述问题, 本研究构建了一种工程化细胞外泌体(exosome, Exo)平台, 用于靶向递送m⁶A甲基转移酶样蛋白3(methyltransferase-like 3, METTL3), 以重编程RNA表观遗传稳态. 通过在外泌体表面修饰叶酸(folic acid, FA)配体, 该系统能够特异识别并富集于三阴性乳腺癌(triple negative breast cancer, TNBC)组织, 实现高效而精准的基因递送. 且在本研究中, METTL3的过表达可有效恢复m⁶A依赖的RNA降解通路, 并选择性降低RPL19 mRNA的稳定性, 从而在体内外实验中显著抑制肿瘤生长. 该递送系统具有优良的生物相容性、极低的脱靶风险及良好的生物安全性, 突破了传统病毒载体和合成载体的主要局限, 为基于METTL3的TNBC靶向治疗提供了一种具有广阔应用前景的新策略.

关键词 三阴性乳腺癌(TNBC), m⁶A RNA甲基化, 甲基转移酶样蛋白3(METTL3), 细胞外泌体, 叶酸功能化外泌体

引用格式: 李艳, 罗冰洁, 陈穗芳, 等. 工程化外泌体通过m⁶A调控的RPL19 mRNA稳定性实现恶性肿瘤精准基因治疗. 科学通报, 2026, 71: 4311–4328

Li Y, Luo B, Chen S, et al. Engineered vesicular system modulates m⁶A-dependent RNA stability for precision gene therapy of malignant tumors (in Chinese). Chin Sci Bull, 2026, 71: 4311–4328, doi: [10.1360/CSB-2025-5862](https://doi.org/10.1360/CSB-2025-5862)

三阴性乳腺癌(triple negative breast cancer, TNBC)是缺乏雌激素受体(estrogen receptor, ER)、孕激素受体(progesterone receptor, PR)和人表皮生长因子受体2(human epidermal growth factor receptor 2, HER2)为特征的一类乳腺癌亚型,其在乳腺癌患者中占比高达15%^[1~3]. TNBC具有高度侵袭性、易发生远处转移及预后不良等临床特征^[4,5]. 目前,尚无针对TNBC的有效靶向治疗手段,化疗(尤其是紫杉类药物)仍为主要的一线治疗方案^[6~8]. 然而,患者耐药性是导致治疗失败的常见原因. 正因如此,我们迫切需要探索更有效的治疗策略.

N⁶-甲基腺苷(N⁶-methyladenosine, m⁶A)是真核生物mRNA中最常见的内部修饰形式,在mRNA的剪接、核输出、稳定性及翻译调控等多种RNA代谢过程中发挥关键作用^[9~12]. 由于m⁶A甲基化对基因表达与细胞功能具有重要调控意义,其动态平衡受到精密调控;一旦这一平衡被破坏,即可能导致包括肿瘤在内的多种疾病的发生^[11,13]. m⁶A修饰的生物学丰度与功能由甲基转移酶复合物(“写入器”)、去甲基化酶(“擦除器”)以及m⁶A结合蛋白(“读取器”)三者之间的动态相互作用所决定^[10]. 研究表明, m⁶A调控因子的异常可作为致癌驱动因素或肿瘤抑制因子,在肿瘤微环境中调节癌症的发生、进展、转移、代谢重编程及免疫逃逸等过程^[14~17].

甲基转移酶样蛋白3(methyltransferase-like 3, METTL3)是m⁶A甲基化过程中的核心甲基转移酶,可与甲基转移酶样蛋白14(METTL14)及WT1相关蛋白(WT1-associated protein, WTAP)形成复合体,催化m⁶A修饰在mRNA上的沉积^[10,18]. 在子宫内膜癌中,已有研究表明METTL3具有抑癌作用^[19,20]. 我们前期研究亦发现, METTL3低表达与TNBC患者的不良预后密切相关^[21]. 目前,已有小分子化合物及病毒载体被开发用于促进METTL3表达,从而恢复m⁶A甲基化平衡并抑制TNBC进展^[22,23]. 然而,这类治疗策略仍存在选择性差、肿瘤靶向性不足以及潜在的系统毒性和免疫原性等问题,限制了其临床应用. 因此,亟需建立一种兼具高效与安全性的靶向递送系统,以提升基于m⁶A调控因子的治疗效果.

工程化细胞外泌体(exosome, Exo)因其优良的生物相容性、较强的组织穿透能力以及多样的药物负载特性,近年来被视为极具潜力的基因治疗递送载体^[24~26]. 然而,全身给药后Exo常在肝脏与脾脏中迅速富集,限

制了其特定器官或组织的精准靶向能力^[27~29]. 值得注意的是,叶酸(folic acid, FA)受体在高级别TNBC及化疗后残留肿瘤中高表达,使其成为TNBC治疗中理想的药物递送靶点^[30,31]. 针对上述问题,本研究采用N-羧基琥珀酰亚胺-聚乙二醇-叶酸(N-hydroxysuccinimide-polyethylene glycol-folic acid, NHS-PEG-FA)对Exo进行功能化修饰,以增强其对TNBC组织的特异性靶向. 该修饰不仅可促进药物在肿瘤部位的富集,还能有效降低脱靶效应,从而提升整体治疗效能.

本研究构建了经NHS-PEG-FA修饰的工程化Exo,用于靶向递送METTL3 cDNA质粒,旨在通过调控RPL19 mRNA的表观遗传修饰实现TNBC治疗. 结果表明, NHS-PEG-FA修饰显著提高了FA-Exo的肿瘤靶向效率,实现了METTL3在肿瘤组织中的精准递送. 通过过表达METTL3,工程化Exo可显著提升RPL19 mRNA的m⁶A甲基化水平,促进其降解,从而抑制肿瘤进展. 本研究提出了一种高效、低毒的METTL3靶向递送策略,展示了m⁶A表观遗传调控在肿瘤精准治疗中的广阔应用前景.

1 实验方法

1.1 试剂与细胞培养

SUM-159-PT与MDA-MB-231细胞系购自上海酶研生物科技有限公司(中国), 4T1小鼠乳腺癌细胞与RAW264.7小鼠巨噬细胞样细胞购自普诺赛(中国). MDA-MB-231细胞采用含10%胎牛血清(fetal bovine serum, FBS, 164210-50, 普诺赛)与1%青霉素-链霉素(penicillin-streptomycin, P/S, PB180120, 普诺赛)的杜尔贝科改良Eagle培养基(Dulbecco's modified eagle medium, DMEM, C11995500BT, GIBCO, 美国)进行培养. SUM-159-PT、4T1及RAW 264.7细胞采用同样含10% FBS与1% P/S的RPMI-1640培养基(PM150110, 普诺赛)进行培养. 所有细胞均置于37℃、5% CO₂的湿润恒温培养箱中培养.

本研究所用抗体包括: METTL3(#86132)、RPL19(#14701-1-AP)、GAPDH(#5174)、Ki-67(#9449)及HRP标记的二抗(#7076, #7074)均购自Cell Signaling Technology, Inc.(美国). 此外, 1,1'-dioctadecyl-3,3',3'-tetramethylindocarbocyanine perchlorate(DIL, C10360)与1,1'-Dioctadecyl-3,3',3'-tetramethylindocarbocyanine perchlorate(DID, C1039)均购自碧云天(中国), 鬼笔

环肽与DAPI均购自MedChemExpress(美国)。

1.2 质粒构建

与绿色荧光蛋白(green fluorescent protein, GFP)融合的METTL3 cDNA质粒由上海吉凯基因有限公司(中国)合成。该质粒包含以下序列: CMV增强子-MCS-3flag-polyA-EF1A-zsGreen-sv40-puromycin(小鼠)和CMV增强子-MCS-3flag-polyA-EF1A-zsGreen-sv40-puromycin(人类)。使用*Bam*H I和*Kpn* I限制性内切酶进行基因插入,并通过DNA测序验证最终构建的表达载体,具体引物序列如下: 小鼠Mettl3(NM_019721.2): Mettl3(62891-1)-p1(5'-CACACTGGACTAGTG-GATCCCGCCACCATGTCTGGACACGTGGAGCTC-3'), Mettl3(62891-1)-p2(5'-AGTCACTTAAGCTTGGTACTAAATCTTAGGTTTAGAGATGATGCCGTC-3'); 人类METTL3(NM_019852.5): METTL3(65839-1)-p1(5'-CACACTGGACTAGTGGATCCCGCCACCATGTCTGGACACGTGGAGCTC-3'), METTL3(65839-1)-p2(5'-AGTCACTTAAGCTTGGTACTAAATCTTAGGTTTAGAGATGATAC-3')。

1.3 Exo的制备、分离与表征

RAW 264.7小鼠巨噬细胞被置于37℃、5% CO₂条件下,使用含10% FBS与1% P/S的RPMI-1640培养基进行培养。当细胞融合度达到约70%时,用磷酸盐缓冲液(phosphate buffered saline, PBS)洗涤细胞,在无外泌体胎牛血清培养基(exosome-depleted FBS, 41210ES76, 翌圣生物, 中国)中继续培养48 h。接着收集细胞培养上清液,在3000 r/min下离心15 min以去除细胞和碎片。随后将上清液转移至无菌容器中,按5:1的体积比(样品体积: ExoQuick-TC体积)加入ExoQuick-TC沉淀剂。混匀后,将溶液置于4℃培养下静置过夜。次日,将混合物以1500 r/min离心30 min,弃去上清液。将分离得到的Exo重悬于无菌1×PBS中,并保存于-80℃下备用。纯化后Exo的蛋白浓度采用BCA蛋白定量试剂盒进行测定。

为构建不同载体量的FA-Exo,首先采用荧光胺测定法对Exo表面的伯胺基团进行量化。然后将不同量的NHS-PEG-FA(P009009, 上海远扬科技, 中国)与Exo上的伯胺基团(NHS酯/伯胺摩尔比分别为0、0.1、0.3和0.6)在室温条件下于PBS中反应4 h。随后通过超速离心收集FA-Exo,并用PBS洗涤以去除未结合的NHS-PEG-FA。为进行荧光标记,将纯化后的FA-Exo分别与DIL(用

于体外实验)或DID(用于体内实验)在37℃避光条件下孵育10 min。最后使用100 kD超滤离心管(MilliporeSigma, 德国)去除多余染料。

为制备METTL3+FA-Exo,使用Exo-Fect外泌体转染试剂盒(EXFT20A-1, System Biosciences, 美国)将GFP标记的METTL3 cDNA质粒(上海吉凯基因有限公司)转染至FA-Exo中。转染体系配比为: 10 μL Exo-Fect试剂、20 μL METTL3-GFP质粒(10 μg)、70 μL无菌1×PBS和50 μL FA-Exo(10 μg)。轻轻混匀后,于37℃摇床上孵育10 min,随后立即置于冰上。为终止反应,加入30 μL ExoQuick-TC,充分混匀后冰浴30 min。随后以13000~14000 r/min离心3 min以弃去上清液。转染后的Exo用200 μL 1×PBS重悬。纯化后METTL3+FA-Exo的蛋白浓度采用BCA蛋白检测试剂盒进行测定,并将样品置于-80℃下保存。

METTL3+FA-Exo的表征包括:使用4%乙酸铀酰锌进行负染,并使用透射电子显微镜(transmission electron microscope, TEM, HT7800, HITACHI, 日本)进行观察;使用纳米颗粒跟踪分析(nanoparticle tracking analysis, NTA, ZetaView, Particle Metrix, 德国)测定其粒径分布;使用动态光散射(dynamic light scattering, DLS, Zetasizer Pro, Malvern Panalytical, 英国)测定其光学参数;使用DLS(Zetasizer Nano ZSE, Malvern Panalytical)测定其Zeta电位。

1.4 细胞划痕实验

细胞划痕迁移实验参照既往研究方法进行^[21]。将细胞按每孔 2×10^5 的密度接种至6孔板中,使用200 μL灭菌枪头沿直尺在单层细胞上制造划痕,吸干培养基并用PBS洗涤2~3次以去除划下的细胞。随后分别给予Exo(对照组)、FA-Exo及METTL3+FA-Exo处理(各组Exo数量相同,浓度均为 1×10^{10} particles/mL,每孔100 μL),并添加含1%血清的培养基。在0与24 h分别拍摄图像,观察细胞迁移能力的变化。

1.5 克隆形成实验

克隆形成实验参照既往研究方法进行^[32]。将细胞以每孔700~1000个的密度接种至6孔板中,设置三个复孔,分别给予Exo(对照组)、FA-Exo及METTL3+FA-Exo处理(各组Exo数量相同,浓度均为 1×10^{10} particles/mL,每孔100 μL)。继续培养15 d,期间每3 d更换一次培养液。培养结束后,用PBS洗涤细胞3次,加入1 mL 4%多

聚甲醛固定10 min, 再次用PBS洗涤3次. 洗涤后加入1 mL结晶紫染色液10 min, 然后弃去染色液, 用PBS反复冲洗细胞, 室温晾干后拍照记录.

1.6 流式细胞术检测细胞凋亡

采用Annexin V-FITC/PI细胞凋亡检测试剂盒(AD10, DOJINDO, 日本)及流式细胞仪(FACSCanto, Becton Dickinson, 美国)进行细胞凋亡检测. 实验步骤如下: 将各组细胞用不含EDTA的胰酶消化后, 用PBS洗涤两次. 加入预配制的1×Annexin V结合溶液, 将细胞浓度调整为 1×10^6 cells/mL. 取100 μ L细胞悬液至流式管中, 依次加入5 μ L Annexin V-FITC和5 μ L PI, 室温避光孵育15 min后, 立即进行流式细胞术检测.

1.7 蛋白质免疫印迹分析(Western blot, WB)

将细胞接种至6孔板中, 分别给予Exo(对照组)、FA-Exo及METTL3+FA-Exo处理(各组Exo数量相同, 浓度均为 1×10^{10} particles/mL, 每孔100 μ L), 继续培养24 h. 每孔加入含10% PMSF(ST506, 碧云天)的RIPA裂解液(P0013B, 碧云天), 在冰上裂解20 min后, 于4℃条件下以12000 r/min离心15 min以收集上清液, 并采用BCA蛋白定量试剂盒(23227, Thermo Fisher, 美国)测定总蛋白含量. 随后通过10%的SDS-PAGE凝胶进行蛋白分离, 并转印至PVDF膜(1620112, Bio-Rad, 美国). 用5%脱脂牛奶封闭1 h, 洗涤3次后分别与一抗、二抗孵育. 采用ECL化学发光试剂盒(MA0186-2, 美仑生物, 中国)和Gel Doc XR+化学发光成像系统(Bio-Rad)系统进行显影成像, 并使用ImageJ软件进行图像分析.

1.8 DNA提取与逆转录实时定量聚合酶链反应(reverse transcription-polymerase chain reaction, RT-qPCR)

采用动物组织/细胞基因组DNA提取试剂盒(D1700, 索莱宝, 中国)从携带质粒的Exo中提取DNA. 使用紫外分光光度计(Thermo Fisher)定量测定DNA浓度. RT-qPCR在CFX Opus96荧光定量PCR系统(Bio-Rad)上进行, 并使用2×RealStar Fast Pro染料预混液(A401-05, 康润生物, 中国). 采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算基因相对表达量. 本研究使用的序列如下: RPL19: 5'-AGCCTGTGACGGTCCATTCC-3'; 18S: 5'-CGAACGTCTGCCCTATCAACTT-3'; METTL3: 5'-CTGTGTCCA-

TCTGTCTTGCCATCTC-3'; Bax: 5'-AAGGTGCCGGA-ACTGATCAG-3'; Bcl-2: 5'-GAACTGGGGGAGGAT-TGTGG-3'; si RPL19: 5'-CCACAUGUAUCACAGCCU-GUATTUACAGGCUGUGAUACAUGUGGTT-3'

1.9 Exo的细胞摄取

采用细胞膜染料DID(C1036, 碧云天)对Exo进行标记. 将细胞按每孔 2×10^4 个的密度接种于共聚焦培养皿中, 培养24 h使其充分贴壁. 随后加入经DID标记的Exo, 继续共培养24 h. 培养结束后, 使用鬼笔环肽对细胞骨架进行染色, DAPI对细胞核进行染色. 最后, 利用激光共聚焦超高分辨率显微镜(LSM880, ZEISS, 德国)观察细胞对Exo的摄取情况.

1.10 小鼠异种移植瘤模型成像与活体成像(*in vivo* imaging system, IVIS)系统

本研究中涉及的所有动物均购自广东药康生物科技有限公司(动物许可证编号: 44824700034432), 所有实验操作均严格按照暨南大学动物伦理与使用委员会批准的实验方案(20231127-05)进行. 将 1×10^6 只4T1小鼠乳腺癌细胞皮下注射至BALB/C小鼠左侧腋下1 cm处, 实时观察肿瘤生长情况, 测量肿瘤的长度(L)和宽度(W), 并根据公式 $(L \times W^2)/2$ 计算肿瘤体积. 当肿瘤体积大于100 mm³时视为造模成功, 将小鼠随机分为三组(对照组、METTL3+Exo组和METTL3+FA-Exo组, $n=5$), 以PBS作为对照.

取200 μ g的Exo(1 μ g/ μ L)在37℃下用30 μ m DID(C1039, 碧云天)染色10 min后, 按前述方法离心纯化. 通过尾静脉注射200 μ g经DID标记的METTL3+Exo或METTL3+FA-Exo(1 μ g/ μ L), 随后利用IVIS观察不同时间点Exo在各器官的分布情况. IVIS参数设置为: 最大激发波长644 nm, 最大发射波长665 nm, 视野10 cm, 曝光时间2 s. 为评估METTL3+FA-Exo的质粒递送效率及体内蛋白表达动力学, 通过尾静脉向小鼠注射200 μ g METTL3+FA-Exo($n=15$). 随后, 分别于特定时间点(12、24、48、72和96 h)处死小鼠并采集肿瘤组织. 对肿瘤组织进行免疫荧光分析, 通过GFP与METTL3蛋白的共定位情况评估不同时间点的蛋白表达水平. 为评估抗肿瘤效果, 将荷瘤小鼠随机分为三组($n=5$): 对照组、FA-Exo组和METTL3+FA-Exo组, 以PBS作为对照. 每3 d给小鼠注射一次PBS、FA-Exo或METTL3+FA-Exo(剂量均为10 mg/kg). 治疗结束后处死小鼠, 取肿瘤组

织称重, 并进行H&E染色及METTL3、Ki-67和RPL19的免疫荧光染色分析。

1.11 苏木精-伊红(hematoxylin-eosin, H&E)染色

使用PBS充分洗涤组织, 以滤纸吸干表面水分后, 将组织完全浸没于4%多聚甲醛溶液中, 于4℃条件下静置过夜。组织固定完成后, 依次进行脱水处理、石蜡包埋, 并使用Leica EM UC7/FC7超薄切片机进行切片。切片经H&E染色后, 最终置于显微镜下观察组织结构。

1.12 免疫荧光染色

组织切片完成H&E染色中的脱蜡步骤后, 进行抗原修复, 于室温条件下封闭血清蛋白, 随后分别与未标记荧光的一抗及荧光标记的二抗进行孵育, 最后用甘油封片剂封片, 并置于荧光显微镜下观察。

1.13 小鼠血清的生化指标检测

将采集的全血样本室温静置2 h后, 于4℃条件下以3000 r/min离心15 min, 以获取上层血清。使用全自动五分类动物血液分析仪(HEMAVET 950FS, Drew, 英国), 通过检测血清中ALT、AST、CRE及UREA等生化指标的变化以评估小鼠的肝肾功能。

1.14 甲基化RNA免疫共沉淀测序(methylated RNA immunoprecipitation sequencing, MeRIP-seq)

采用TRIzol试剂(15596026, Invitrogen, 美国)提取总RNA, 并检测RNA浓度、纯度及完整性。使用oligo (dT)磁珠(25-61005, Thermo Fisher)富集Poly(A) RNA, 随后进行片段化处理。片段化后的RNA分为两部分, 一部分作为Input对照构建RNA-seq文库, 另一部分与m⁶A特异性抗体(202003, Synaptic Systems, 德国)及免疫磁珠孵育, 进行甲基化RNA免疫共沉淀以富集m⁶A修饰RNA片段。Input样本与免疫共沉淀样本分别进行双链cDNA合成、接头连接、磁珠筛选纯化及PCR扩增, 完成文库构建。文库经质控合格后, 采用Illumina Nova-Seq™ 6000测序平台进行双末端测序, 测序模式为PE150。结合Input RNA-seq与MeRIP-seq数据进行后续分析, 以鉴定m⁶A修饰水平显著变化的转录本。本实验产生的测序数据已上传至国家生物信息中心(PRJCA061547)。

1.15 mRNA稳定性测定

将细胞接种至六孔板中, 分别给予FA-Exo或METTL3+FA-Exo(各组Exo数量相同, 浓度均为 1×10^{10} particles/mL, 每孔100 μ L)处理并培养24 h后, 加入放线菌素D(HY-17559, MedChemExpress)抑制转录。分别收集经0、9和12 h处理的细胞, 使用TRIzol试剂提取总RNA, 并通过RT-qPCR检测RPL19 mRNA表达水平的变化, 以评估其稳定性。

1.16 统计学分析

采用GraphPad Prism 8科学统计软件(GraphPad Software, Inc., 美国)进行数据分析。组间比较使用单因素方差分析(ANOVA), 或单因素ANOVA结合双样本等方差Student's *t*检验。数据以至少3次独立实验的均值 $\pm$ 标准误表示。显著性阈值设定为: **P*<0.05; ***P*<0.01; ****P*<0.001; *****P*<0.0001。

2 实验结果

2.1 METTL3+FA-Exo的制备与表征

采用ExoQuick-TC外泌体提取试剂从RAW 264.7小鼠巨噬细胞上清中分离并纯化外泌体。WB结果显示, 所获外泌体表达其标志蛋白CD81、HSP70和CD63, 而高尔基体标志蛋白GM130未检测到表达(图1(a))。进一步对外泌体进行物理表征: TEM图像显示其呈现典型的圆形或双凹碟形结构(图1(b)); NTA测得外泌体的平均粒径为141.65 nm, 颗粒浓度为 2.1×10^{11} particles/mL(图1(c)); 其Zeta电位为 -8.3 ± 1.4 mV(图S1(a))。

随后, 我们采用后插入法, 利用NHS-PEG-FA对外泌体进行功能化修饰。DLS分析结果显示, 在不同NHS酯/伯胺摩尔比(0、0.1、0.3和0.6)下制备的叶酸修饰外泌体(FA-Exo), 其粒径相较于未修饰外泌体均增加约10~50 nm, 表明NHS-PEG-FA已成功连接于外泌体表面(图S1(b))。粒径的增加及对应的多分散指数值(polydispersity index, PDI)为: 0.1 FA-Exo为0.1460, 0.3 FA-Exo为0.1901, 以及0.6 FA-Exo为0.3664。

已有的研究报道适度的功能化修饰有助于维持纳米颗粒的结构完整性与有效性^[29,33]。综合考虑功能化效率与结构稳定性, 我们最终选择摩尔比为0.3的FA-Exo用于后续实验(图S1(c), 图1(d))。0.3 FA-Exo形态完整(图1(e)), NTA测定其平均粒径约为165.75 nm(图S1

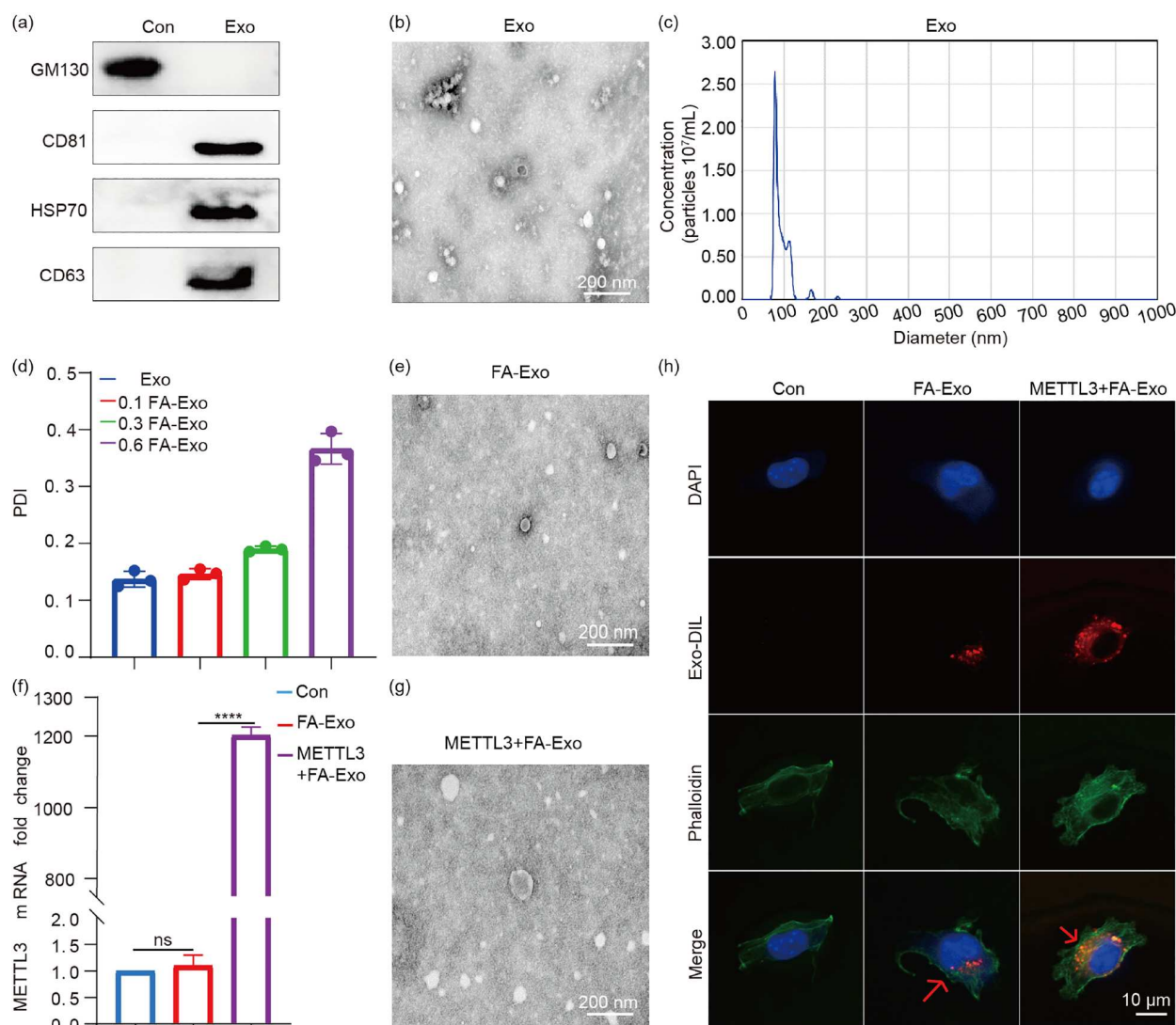


图 1 (网络版彩色)METTL3+FA-Exo的制备与表征. (a) 蛋白质免疫印迹分析显示GM130、CD81、HSP70和CD63在对照组与Exo组中的表达情况. (b) Exo的透射电子显微镜图像. 比例尺: 200 nm. (c) 通过纳米颗粒跟踪分析表征的Exo粒径分布. (d) 通过DLS分析不同FA-Exo制剂的PDI. (e) FA-Exo(0.3)的透射电子显微镜图像. 比例尺: 200 nm. (f) METTL3 mRNA的RT-qPCR分析. (g) METTL3+FA-Exo的透射电子显微镜图像. 比例尺: 200 nm. (h) 共聚焦激光扫描显微镜观察SUM-159-PT细胞对对照组(PBS)、FA-Exo和METTL3+FA-Exo的内化情况(蓝色: DAPI, 红色: Exo-DIL, 绿色: 鬼笔环肽). 红色箭头指示外泌体. 比例尺: 10 μ m. 数据以均值 $\pm$ 标准误表示. ns, 无显著性差异; **** P <0.0001

Figure 1 (Color online) Preparation and characterization of METTL3+FA-Exo. (a) WB analysis showing the expression of GM130, CD81, HSP70, and CD63 in control group (Con) and Exo. (b) Transmission electron microscopy images of Exo. Scale bar: 200 nm. (c) Size distribution of Exo characterized by nanoparticle tracking analysis. (d) PDI of different FA-Exo formulations analyzed by DLS. (e) Transmission electron microscopy images of FA-Exo (0.3). Scale bar: 200 nm. (f) RT-qPCR analysis of METTL3 mRNA. (g) Transmission electron microscopy images of METTL3+FA-Exo. Scale bar: 200 nm. (h) Confocal laser scanning microscopy visualizing the internalization of Con (PBS), FA-Exo and METTL3+FA-Exo by SUM-159-PT cells (Blue: DAPI; Red: exo-DIL; Green: phalloidin). Red arrows indicate Exo. Scale bar: 10 μ m. Data are presented as mean $\pm$ SEM. ns, not significant; **** P <0.0001

(d)), Zeta电位为 -11.8 ± 0.7 mV(图S1(j)), 表明工程化修饰过程未破坏其结构完整性.

随后, 通过转染将METTL3 cDNA质粒成功装载至FA-Exo中. 定量PCR(quantitative PCR, qPCR)分析显示, METTL3+FA-Exo中METTL3 mRNA的表达水平较对

照FA-Exo显著上调约1200倍, 表明METTL3已被成功包装于外泌体中(图1(f)). TEM、NTA及DLS结果进一步证实, METTL3+FA-Exo仍保持良好的结构完整性, 仅粒径略有增大(图1(g), 图S1(e, f)); 其Zeta电位为 -15.65 ± 1.15 mV(图S1(i)). 共聚焦显微镜图像显示,

SUM-159-PT细胞可有效摄取FA-Exo及METTL3+FA-Exo(图1(h)).

此外,稳定性测试结果表明,经10%血清培养基中孵育4 d后,负载于FA-Exo中的METTL3仍保持良好稳定性,其粒径与PDI约287 nm与0.276(图S1(g, h)),提示该工程化外泌体系统在未来临床应用中具有良好潜力。

2.2 METTL3+FA-Exo的体外抗肿瘤作用

为评估METTL3+FA-Exo的体外抗肿瘤作用,本研究以三阴性乳腺癌细胞系MDA-MB-231与SUM-159-PT为模型,分别给予METTL3+FA-Exo处理,并检测METTL3的表达水平。结果显示,两种细胞中METTL3均成功过表达(图S2(a))。细胞迁移与克隆形成实验进一步表明, METTL3+FA-Exo能够显著抑制肿瘤细胞的迁移能力与克隆增殖活性,效果优于其他处理组(图2(a~d))。此外,在相同外泌体处理剂量下, METTL3+FA-Exo组相比FA-Exo组表现出更高的细胞摄取效率与更强的肿瘤细胞抑制能力。流式细胞术分析进一步显示, METTL3+FA-Exo处理可显著诱导细胞凋亡(图2(e))。综上, METTL3+FA-Exo在体外表现出显著的抗肿瘤活性。

2.3 METTL3+FA-Exo治疗作用的分子机制

为探究METTL3+FA-Exo治疗作用的分子机制,我们进行了MeRIP-seq分析。结果显示, m^6A 修饰峰主要富集于mRNA的3'非翻译区(图3(a, b), 图S3(a))。序列基序分析进一步表明, m^6A 修饰发生在保守的“RRACH”序列中(R=G/A, H=A/C/U)(图3(c))。基因本体(gene ontology, GO)与京都基因与基因组百科全书(Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, KEGG)通路富集分析显示,发生 m^6A 修饰的基因显著富集于多种肿瘤相关通路,提示METTL3在肿瘤发生与发展中具有重要调控功能(图3(d), 图S3(b, c))。为进一步筛选关键下游靶点,我们整合MeRIP-seq与转录组测序(RNA sequencing, RNA-seq)数据,共鉴定出8个候选基因,其中RPL19在 m^6A 修饰丰度与基因表达量上均呈现显著变化(筛选阈值: $\text{diffPeak.log}_2(\text{fc}) \geq 1$, $\text{diffExp.gene.log}_2(\text{fc}) \geq 1.5$)(图S3(d))。蛋白质印迹验证结果显示, RPL19蛋白表达水平在METTL3+FA-Exo处理后显著下调(图3(e))。以上结果表明, METTL3可能通过调控RPL19表达发挥其抗肿瘤作用。

2.4 敲低RPL19 诱导凋亡并抑制增殖

为明确RPL19在介导METTL3+FAExo抗肿瘤作用中的关键功能,我们在三阴性乳腺癌细胞系MDA MB 231和SUM 159 PT中利用小干扰RNA(small interfering RNA, siRNA) RPL19建立了稳定的RPL19敲低细胞模型(图4(a))。结果显示,敲低RPL19可显著上调促凋亡因子BAX的mRNA表达,同时下调抗凋亡因子Bcl2的mRNA水平,提示RPL19敲低能够促进细胞凋亡(图4(b))。此外,细胞计数试剂盒-8(cell counting kit 8, CCK-8)实验进一步表明,敲低RPL19明显抑制了TNBC细胞的增殖活力(图4(c))。以上结果证实,敲低RPL19可有效抑制肿瘤细胞活性,从而支持了“METTL3+FAExo通过调控RPL19 mRNA稳定性发挥抗肿瘤作用”这一机制假说。

2.5 METTL3+FA-Exo通过 m^6A 修饰促进RPL19 mRNA降解

为进一步验证METTL3+FA-Exo是否通过 m^6A 修饰调控RPL19 mRNA,我们分析了MeRIP-seq数据的IGV峰值图谱,结果显示METTL3+FA-Exo处理显著提高了RPL19 mRNA上的 m^6A 修饰水平(图5(a))。已知 m^6A 修饰可参与调节mRNA的核质转运、稳定性及剪接等过程。为阐明METTL3调控RPL19 mRNA的具体机制,我们首先检测了其可变剪接的影响。ASprofile软件分析表明,各组间RPL19 mRNA的剪接模式无显著差异(图5(b))。随后,通过亚细胞分布实验发现, METTL3+FA-Exo处理并未影响RPL19 mRNA的核质转运(图5(c))。进一步,我们探讨了METTL3+FA-Exo是否通过 m^6A 修饰促进RPL19 mRNA的降解。在放线菌素D阻断新生转录后, METTL3+FA-Exo处理组中RPL19 mRNA的降解速率显著高于对照组,处理12 h后的降解速率约为对照组的4.78倍(图5(d))。上述结果表明, METTL3+FA-Exo可能通过增强RPL19 mRNA的 m^6A 修饰,进而加速其降解,发挥抗肿瘤作用。

2.6 METTL3+FA-Exo的体内分布特征

为评估METTL3+FA-Exo的肿瘤靶向性与组织富集效果,我们通过IVIS系统观察了其在荷瘤小鼠体内的分布情况。实验首先建立荷瘤小鼠模型,经尾静脉注射200 μg DID标记的METTL3+FA-Exo或METTL3+Exo,并以PBS组作为对照。随后,利用活体成像系统

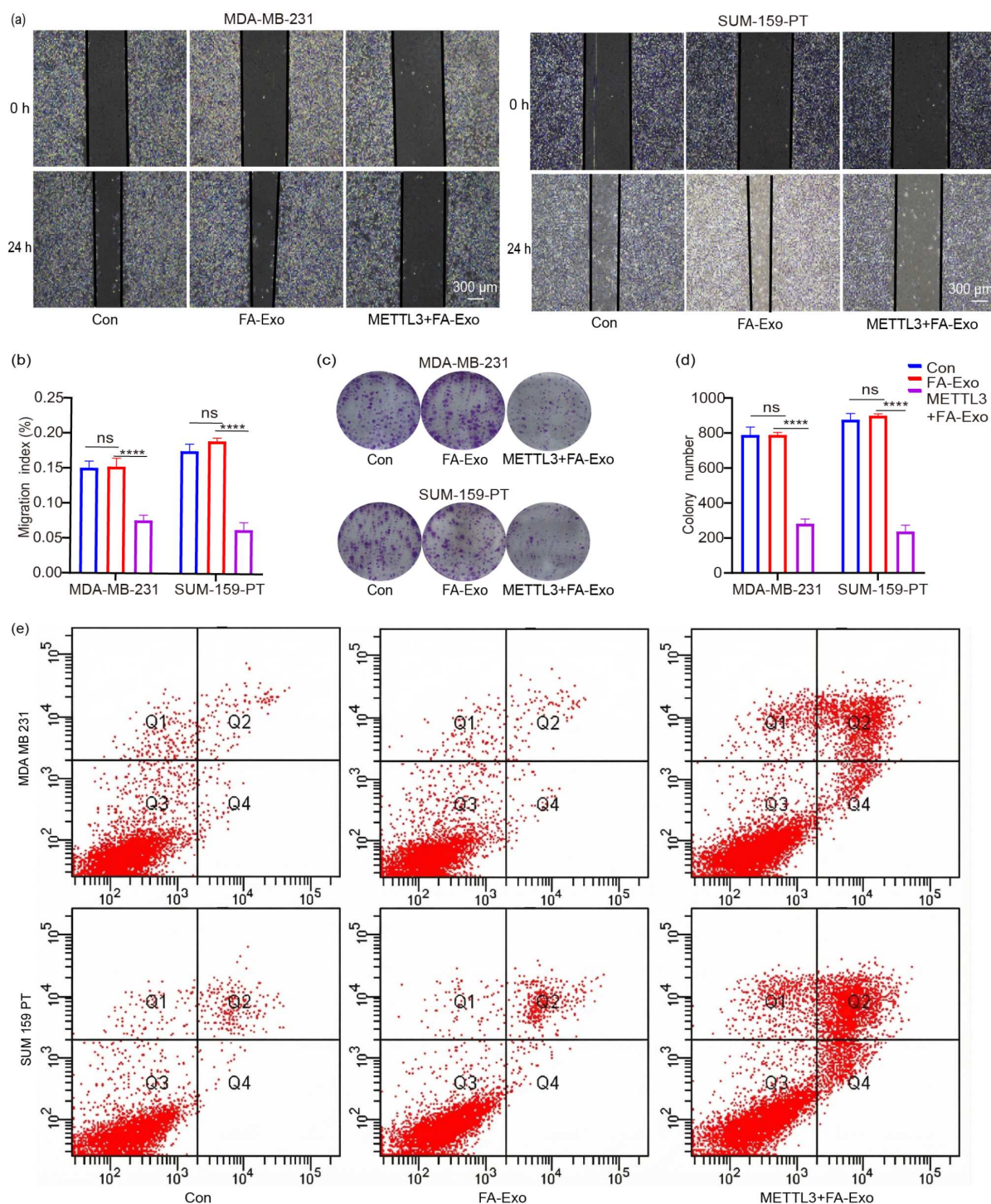


图 2 (网络版彩色)METTL3+FA-Exo的体外抗肿瘤作用. (a, b) 通过细胞划痕实验评估TNBC细胞经不同处理(对照组Exo、FA-Exo及METTL3+FA-Exo)后的细胞迁移能力. 比例尺: 300 μ m. (c, d) 通过平板克隆形成实验评估经不同处理(对照组Exo、FA-Exo及METTL3+FA-Exo)后细胞的增殖能力. (e) 利用Annexin V-FITC/PI染色后, 通过流式细胞术分析经不同处理(对照组Exo、FA-Exo及METTL3+FA-Exo)后TNBC细胞的凋亡情况. 数据均以均值 $\pm$ 标准误表示. ns, 无显著性差异; **** P < 0.0001

Figure 2 (Color online) Anti-tumor effect of METTL3+FA-Exo *in vitro*. (a, b) Scratch test in TNBC cells to assess cell migration rates after treatment with Con (Exo), FA-Exo, or METTL3+FA-Exo. Scale bar: 300 μ m. (c, d) Plate cloning assay to evaluate cell proliferation ability after treatment with Con (Exo), FA-Exo, or METTL3+FA-Exo. (e) Flow cytometry analysis of TNBC cells stained with Annexin V-FITC/PI after treatment with Con (Exo), FA-Exo, or METTL3+FA-Exo. Data are presented as mean $\pm$ SEM. ns, not significant; **** P < 0.0001

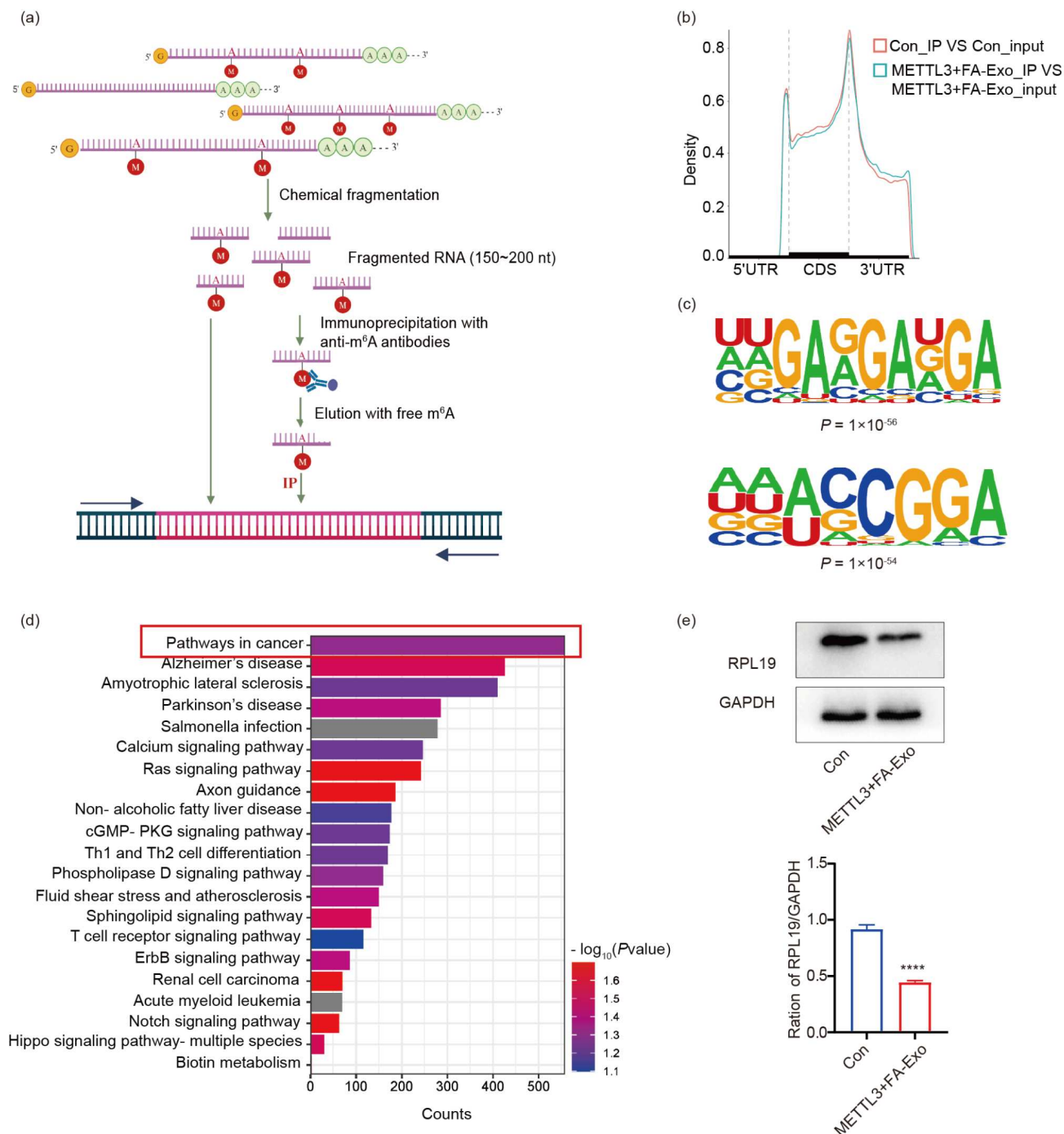


图 3 (网络版彩色)MeRIP-seq明确METTL3+FA-Exo治疗TNBC的潜在作用靶点. (a) MeRIP-seq实验流程示意图. (b) mRNA转录本中m⁶A峰值的密度分布. (c) 检测到的主要共有基序“RRACH”. (d) 通过m⁶A-seq分析鉴定的METTL3+FA-Exo调控基因的KEGG通路分析图. (e) 在SUM-159-PT细胞中用对照组(FA-Exo)或METTL3+FA-Exo处理24 h后RPL19的蛋白质免疫印迹分析. 以GAPDH为内参, 校正上样量. 数据以均值 $\pm$ 标准误差表示. **** $P < 0.0001$

Figure 3 (Color online) Identification of Potential Targets Through METTL3 Overexpression via METTL3+FA-Exo Treatment in TNBC. (a) MeRIP-seq experimental workflow. (b) Density distribution of m⁶A peaks across mRNA transcripts. (c) Predominant consensus motif “RRACH” detected. (d) KEGG analysis of genes modulated by METTL3+FA-Exo identified via m⁶A-seq analysis. (e) WB analysis of RPL19 after treatment with Con (FA-Exo) or METTL3+FA-Exo for 24 hours in SUM-159-PT cells. GAPDH was used as the loading control. Data are presented as mean $\pm$ SEM. **** $P < 0.0001$

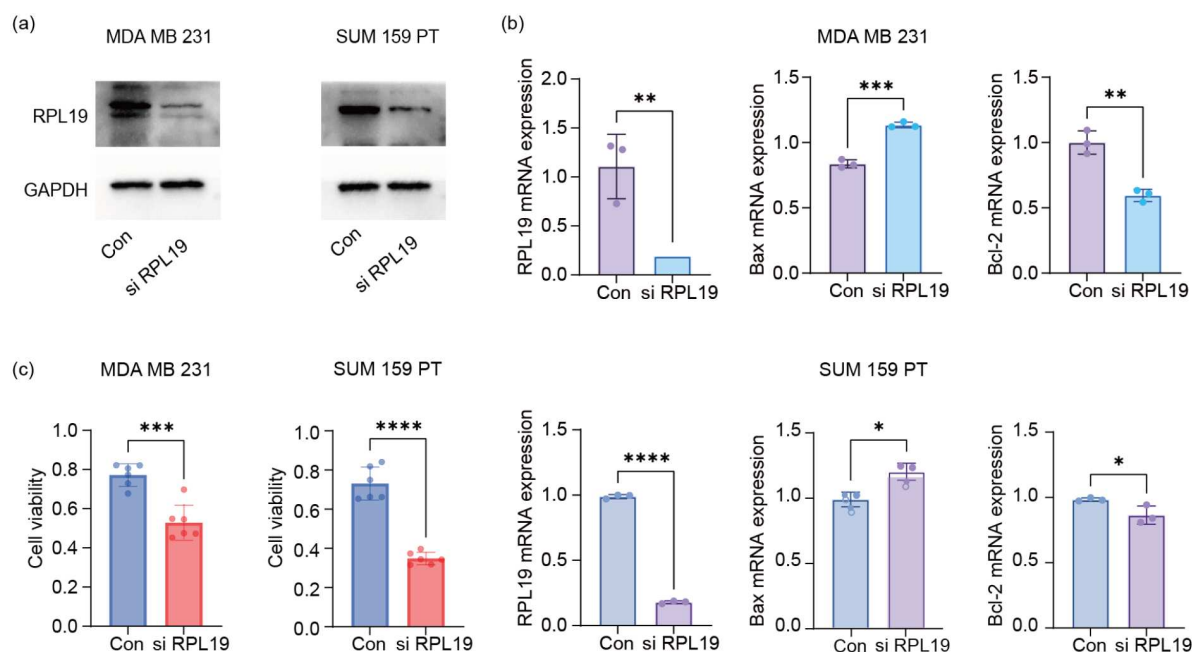


图4 (网络版彩色)敲低RPL19诱导凋亡并抑制增殖。(a) WB检测siRNA RPL19处理24 h后TNBC细胞中RPL19的蛋白表达。(b) qPCR检测siRNA RPL19处理24 h后RPL19、Bax与BCL-2的mRNA表达。(c) CCK-8法检测siRNA RPL19处理24 h后TNBC细胞的增殖活性。以均值±标准误表示。 $*P<0.05$, $**P<0.01$, $***P<0.001$, $****P<0.0001$

Figure 4 (Color online) Knockdown of RPL19 induces apoptosis and inhibits proliferation. (a) WB analysis of RPL19 protein expression in TNBC cells after treatment with siRNA RPL19 for 24 hours. (b) qPCR analysis of RPL19, Bax, and BCL-2 mRNA levels in TNBC cells after treatment with siRNA RPL19 for 24 hours. (c) CCK-8 assay measuring the proliferative activity of TNBC cells after treatment with si RPL19 for 24 hours. Data are presented as mean±SEM. $*P<0.05$, $**P<0.01$, $***P<0.001$, $****P<0.0001$

在注射后12、24和72 h监测外泌体在体内的分布(图6(a)).

结果显示,注射后12 h, METTL3+FA-Exo广泛分布于全身,并在肝脏、脾脏等单核吞噬系统器官中呈现明显富集(图6(a~d)). METTL3+FA-Exo组在肿瘤部位的荧光信号始终较强,提示外泌体在肿瘤组织中有效蓄积(图6(b, d)). 至72 h, 该组肿瘤区域的荧光强度仍为METTL3+Exo组的3倍(图6(b)). 相比之下,其主要器官中的荧光信号较弱,说明叶酸修饰在提升肿瘤靶向能力的同时,并未显著增加在正常组织中的非特异性蓄积。

进一步对冷冻组织切片进行荧光分析显示, DID标记的Exo(黄色信号)主要在肝、脾及肿瘤组织中检出,而在心、肾中分布较少(图6(e)), 图中细胞核经DAPI染色后呈蓝色。肿瘤组织切片中, METTL3+FA-Exo组呈现更强的黄色荧光, 其聚集程度显著高于METTL3+Exo组, 与活体成像结果一致(图6(e)). 以上结果表明, METTL3+FA-Exo具有良好的肿瘤靶向性与组织富集能力, 显示出潜在的转化应用价值。

2.7 FA-Exo介导的METTL3递送与体内蛋白表达动力学

为探究FA-Exo递送METTL3质粒的效能及其在体内的蛋白表达动力学, 我们通过尾静脉向荷瘤小鼠注射约200 μg METTL3+FA-Exo, 并于注射后不同时间点分批处死小鼠, 取肿瘤组织进行免疫荧光分析。结果显示, 注射后12 h即可在肿瘤组织中检测到GFP标记的METTL3蛋白信号, 且荧光强度于第2 d达到峰值(图7(a)). 进一步分析显示, $\text{GFP}^+\text{METTL3}^+$ 蛋白水平在48~96 h内随时间推移逐渐下降(图7(b, c)). 上述结果表明, METTL3+FA-Exo递送后约2~3 d内, 肿瘤组织中METTL3蛋白的表达水平可达峰值。

2.8 METTL3+FA-Exo的体内抗肿瘤作用

为评估METTL3+FA-Exo的体内抗肿瘤效果, 我们构建了荷瘤小鼠模型。如图8(a)所示, 于肿瘤植入第7 d (肿瘤体积 $>100 \text{ mm}^3$, 计算公式: 长 $\times$ 宽 $\times$ 高/2)开始给药, 每隔3 d尾静脉注射一次METTL3+FA-Exo, 共给药7次。

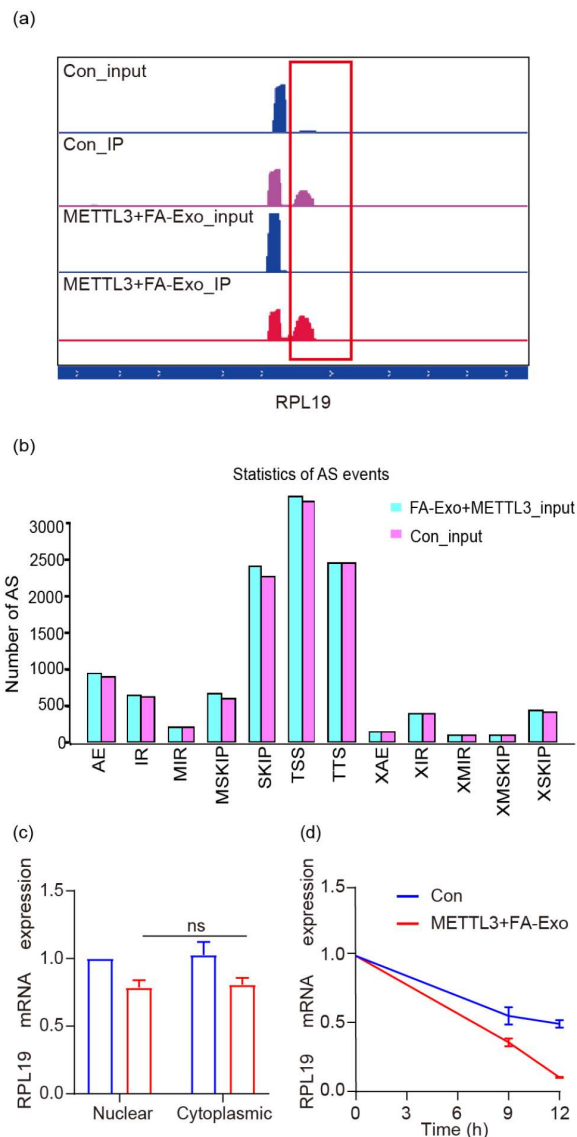


图 5 (网络版彩色)METTL3+FA-Exo促进 m^6A 介导的RPL19 mRNA降解。(a) 经对照组(FA-Exo)或METTL3+FA-Exo处理后, SUM-159-PT细胞中RPL19 mRNA的 m^6A -seq峰值可视化。(b) 在METTL3+FA-Exo处理组与未处理组中, 比较不同形式的可变剪接模式下, RPL19 mRNA的表达情况。(c) 在METTL3+FA-Exo处理组与未处理组中, 检测细胞核与细胞质中新生mRNA的qPCR表达。(d) 在METTL3+FA-Exo处理组与未处理组中, 使用放线菌素D终止mRNA转录后, SUM-159-PT细胞中RPL19 mRNA的半衰期变化。数据以均值 $\pm$ 标准误差表示。ns, 无显著性差异

Figure 5 (Color online) METTL3+FA-Exo promotes m^6A -mediated decay of RPL19 mRNA. (a) m^6A -seq peak visualization of RPL19 mRNA in SUM-159-PT cells after treatment with Con (FA-Exo) or METTL3+FA-Exo. (b) Comparison of RPL19 mRNA under different forms of alternative splicing patterns, with or without METTL3+FA-Exo. (c) qPCR of nascent mRNA in the nucleus and cytoplasm with or without METTL3+FA-Exo. (d) Half-life of RPL19 mRNA in SUM-159-PT cells after treatment with or without METTL3+FA-Exo, followed by termination of mRNA transcription using actinomycin D. Data are presented as mean $\pm$ SEM. ns, not significant

结果显示, METTL3+FA-Exo可显著抑制肿瘤生长, 表现为肿瘤体积与重量的明显减小。FA-Exo组的平均肿瘤体积为METTL3+FA-Exo组的1.57倍(图8(b, c)), 且后者的肿瘤重量也显著低于前者(图8(b, d)), 表明METTL3+FA-Exo具有更强的抑瘤效果。为进一步验证其治疗机制, 我们通过免疫荧光染色检测了肿瘤组织中METTL3蛋白的表达水平。结果显示, METTL3+FA-Exo组中METTL3表达显著上调(图8(e))。同时, 该组中细胞增殖标志物Ki-67的荧光强度明显低于其他组别, 进一步证实其抗肿瘤活性(图8(f))。此外, RPL19蛋白在METTL3+FA-Exo组中也呈现显著下调, 与体外结果一致(图8(g))。以上结果表明, METTL3+FA-Exo可通过 m^6A 依赖性机制上调METTL3并抑制RPL19, 从而有效抑制肿瘤生长。

2.9 METTL3+FA-Exo的安全性评估

为评估METTL3+FA-Exo的体内安全性, 我们在治疗结束后取小鼠心脏、肝脏、肾脏及其他主要器官进行组织病理学分析。苏木精-伊红染色结果显示, 与对照组相比, METTL3+FA-Exo处理组未引起明显的组织结构的病理改变或器质性损伤, 表明该外泌体系统在体内具有较好的生物安全性(图9(a))。

进一步采集小鼠血清进行生化指标分析, 结果显示, METTL3+FA-Exo组中丙氨酸氨基转移酶(alanine aminotransferase, ALT)、天冬氨酸氨基转移酶(aspartate aminotransferase, AST)、肌酐(creatinine, Cre)及尿素氮(urea nitrogen, Urea)的水平均处于正常参考范围, 未见显著异常(图9(b))。以上结果表明, METTL3+FA-Exo在该实验条件下未引发明显的急性毒性反应, 具备良好的体内应用安全基础。

3 结论

本研究构建了一种基于NHS-PEG-FA修饰的工程化外泌体(FA-Exo)纳米递送系统, 用于靶向递送METTL3 cDNA质粒, 旨在通过调控RPL19 mRNA的表观遗传修饰实现TNBC治疗。结果表明, NHS-PEG-FA修饰显著提高了FA-Exo的肿瘤靶向效率, 实现了METTL3在肿瘤组织中的高效、精准递送。

体外实验表明, METTL3+FA-Exo可被TNBC细胞高效摄取, 显著上调METTL3表达, 工程化Exo可显著提升RPL19 mRNA的 m^6A 甲基化水平, 促进其降解, 进而有效抑制肿瘤细胞的增殖与迁移, 诱导细胞凋亡。

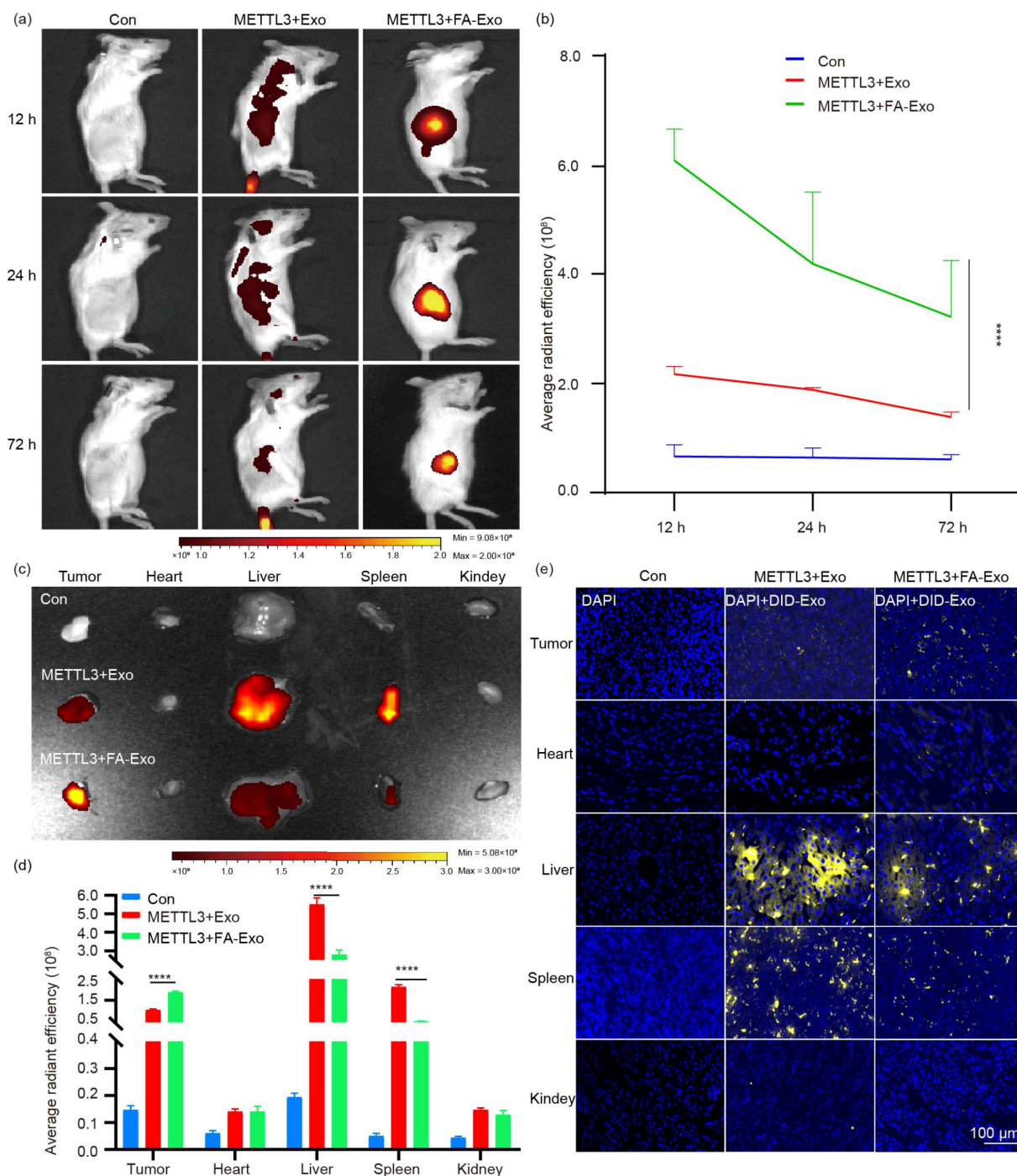


图 6 (网络版彩色)METTL3+FA-Exo在4T1荷瘤小鼠体内的分布情况。(a) 经尾静脉注射对照组(PBS)、METTL3+Exo和METTL3+FA-Exo后的小鼠全身分布图像,在注射后12、24和72 h的特定时间点拍摄图像,每组由 $n=3$ 只小鼠组成。(b) 肿瘤部位随时间变化的荧光强度, $n=3$ 。(c) 尾静脉注射72 h后,肿瘤及各器官中DID标记外泌体的离体荧光成像。(d) 尾静脉注射72 h后,肿瘤及各器官中DID标记外泌体的荧光强度, $n=3$ 。(e) 尾静脉注射72 h后,肿瘤及器官冰冻切片的免疫荧光成像(黄色: DID-Exo, 蓝色: DAPI)。比例尺: 100 μm 。数据以均值 $\pm$ 标准误差表示。**** $P < 0.0001$

Figure 6 (Color online) *In vivo* distribution of METTL3+FA-Exo in 4T1 tumor-bearing mice. (a) Whole-body distribution images of mice after tail vein injection of Con (PBS), METTL3+Exo, and METTL3+FA-Exo. Images were captured at specified time points of 12, 24, and 72 h post-injection. Each group consisted of $n=3$ mice. (b) Fluorescence intensity at the tumor site over time, $n=3$. (c) *Ex vivo* fluorescence imaging of DID-labeled exosomes in tumors and organs 72 h after tail vein injection. (d) Fluorescence intensity of DID-labeled exosomes in tumors and organs 72 h after tail vein injection, $n=3$. (e) Immunofluorescence imaging of frozen sections of tumors and organs 72 h after tail vein injection (yellow: DID-Exo; blue: DAPI). Scale bar: 100 μm . Data are presented as mean $\pm$ SEM. **** $P < 0.0001$

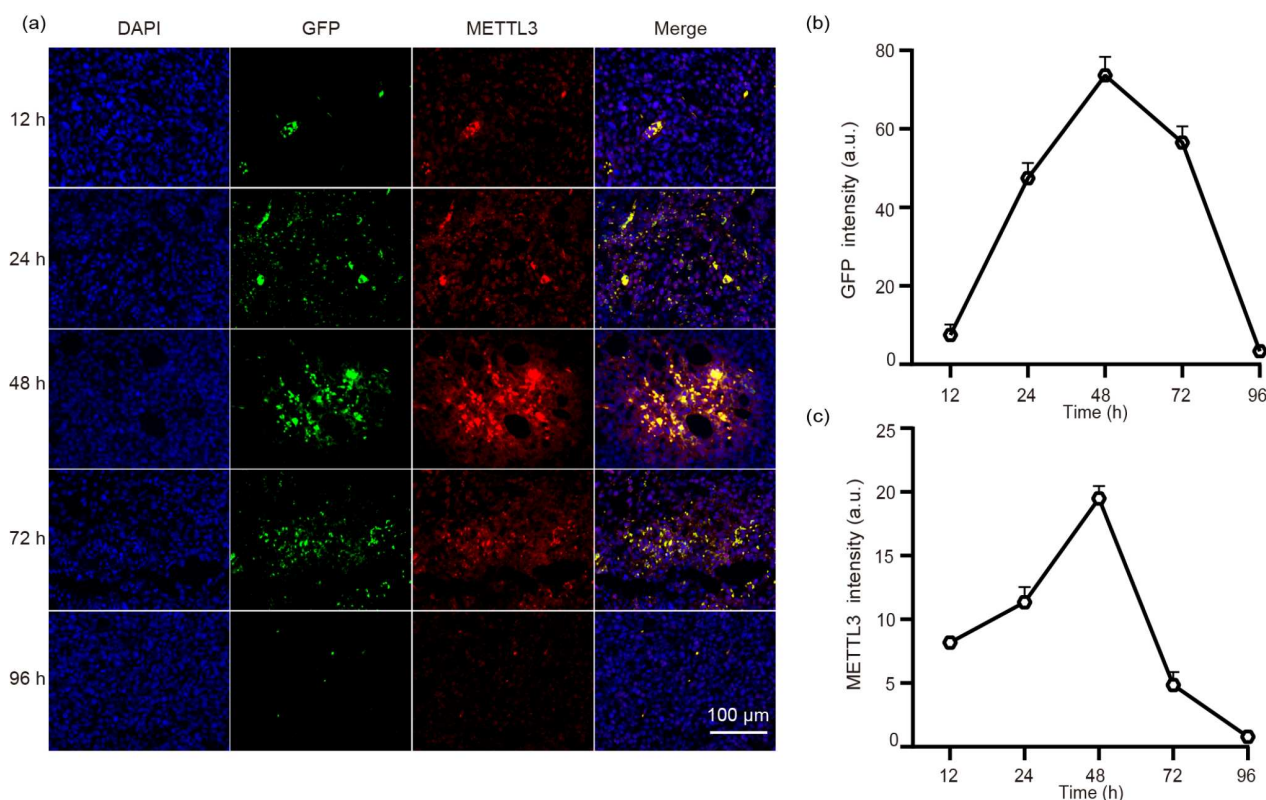


图 7 (网络版彩色)METTL3+FA-Exo在肿瘤组织中介导蛋白表达的体内动力学。(a) 尾静脉注射METTL3+FA-Exo后12、24、48、72及96 h采集肿瘤组织, 通过免疫荧光分析GFP与METTL3蛋白共定位随时间变化情况。比例尺: 100 μm 。(b) METTL3-GFP蛋白表达的荧光强度定量分析, $n=3$ 。(c) METTL3蛋白的荧光强度, $n=3$ 。数据以均值 $\pm$ 标准误表示

Figure 7 (Color online) *In vivo* kinetics of METTL3+FA-Exo-mediated protein expression in tumor tissue. (a) Tumor tissues were collected at 12, 24, 48, 72, and 96 h after tail vein injection of METTL3+FA-Exo. Immunofluorescence analysis was performed to visualize the colocalization of GFP and METTL3 proteins over time. Scale bar: 100 μm . (b) Quantification of fluorescence intensity for METTL3-GFP protein expression, $n=3$. (c) Fluorescence intensity of METTL3 protein, $n=3$. Data are presented as mean $\pm$ SEM

MeRIP-seq联合转录组分析进一步证实, METTL3以 m^6A 依赖的方式促进RPL19 mRNA的降解, 而不影响其剪接或核质转运, RPL19敲低实验亦验证其在细胞增殖与凋亡调控中的关键作用, 明确了RPL19作为其下游功能性靶点的关键地位。

体内分布与抗肿瘤疗效评估显示, METTL3+FA-Exo可于肿瘤组织是实现METTL3蛋白的高效表达, 并维持良好的组织特异性, 减少在肝脏、脾脏等非靶器官的非特异性蓄积。抗肿瘤疗效评估进一步表明, METTL3+FA-Exo处理可显著抑制荷瘤小鼠的肿瘤生长, 降低Ki-67增殖指数, 并伴随RPL19蛋白表达的下调。同时, 该递送系统未引起明显的心、肝、肾毒性, 具备良好的体内生物安全性。

综上所述, FA-Exo构建的纳米递送系统具有良好的生物安全性、显著的肿瘤靶向能力及多功能特性, 展现出作为新型诊疗平台的潜力。该系统不仅可实现DNA、

RNA及蛋白质的高效体内递送, 还为 m^6A 调控因子在TNBC中的表观遗传靶向治疗提供了可行途径。该研究的建立为基于表观遗传调控的精准肿瘤治疗提供了新的思路, 并为未来癌症治疗策略的拓展奠定了基础。

4 讨论

TNBC是一类具有高度侵袭性和预后不良特征的乳腺癌亚型。传统的化疗和放疗虽然仍为主要治疗手段, 但常伴随严重毒副作用且疗效有限^[2,34]。因此, 基因治疗因其高度特异性和较低毒性而被认为是TNBC治疗的潜在新方向^[35,36]。相较于传统疗法, 基因治疗可更精准地作用于肿瘤细胞, 减少对正常组织的损伤, 从而提高治疗的安全性与有效性^[37~39]。

表观遗传调控在肿瘤的发生与发展过程中具有重要作用。近年来, m^6A 作为最常见的RNA修饰之一, 逐渐成为研究热点。 m^6A 通过影响RNA的稳定性、剪接

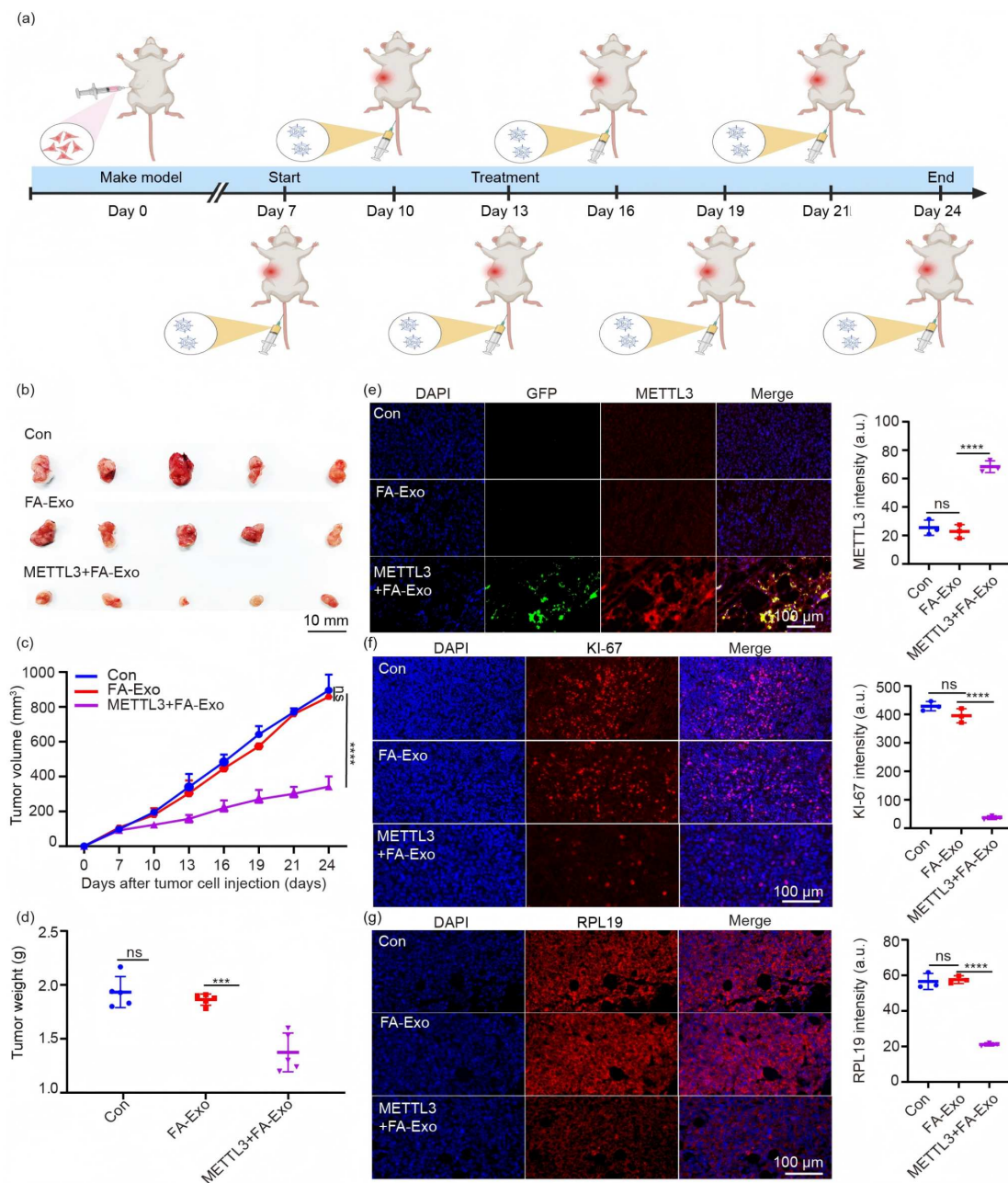


图 8 (网络版彩色)METTL3+FA-Exo的体内抗肿瘤作用. (a) 实验流程示意图(使用BioRender.com制图). (b) BALB/C小鼠肿瘤的代表性图像. 比例尺: 10 mm. (c) 经对照组(PBS)、FA-Exo和METTL3+FA-Exo治疗后的肿瘤体积测量, $n=5$. (d) 经对照组、FA-Exo和METTL3+FA-Exo治疗后的肿瘤重量测量, $n=5$. (e) 对照组、FA-Exo和METTL3+FA-Exo组中GFP与METTL3的免疫荧光染色. 比例尺: 100 μm . 使用ImageJ对肿瘤组织中METTL3进行定量分析, $n=3$. (f) 对照组、FA-Exo和METTL3+FA-Exo组中Ki-67的免疫荧光染色. 比例尺: 100 μm . 使用ImageJ对肿瘤组织中Ki-67进行定量分析, $n=3$. (g) 对照组、FA-Exo和METTL3+FA-Exo组中RPL19的免疫荧光染色. 比例尺: 100 μm . 使用ImageJ对肿瘤组织中RPL19进行定量分析, $n=3$. 数据以均值 $\pm$ 标准误差表示. ns, 无显著性差异; **** $P<0.0001$

Figure 8 (Color online) Anti-tumor effect of METTL3+FA-Exo *in vivo*. (a) Schematic diagram of the experimental procedure (Created with BioRender.com). (b) Representative images showing tumors from BALB/C mice. Scale bar: 10 mm. (c) Tumor volume measurements following treatment with Con (PBS), FA-Exo, and METTL3+FA-Exo, $n=5$. (d) Tumor weight measurements following treatment with Con, FA-Exo, and METTL3+FA-Exo, $n=5$. (e) Immunofluorescence staining of GFP and METTL3 in Con, FA-Exo, and METTL3+FA-Exo groups. Scale bar: 100 μm . Quantification of METTL3 in tumor tissues using ImageJ, $n=3$. (f) Immunofluorescence staining of Ki-67 in Con, FA-Exo, and METTL3+FA-Exo groups. Scale bar: 100 μm . Quantification of Ki-67 in tumor tissues using ImageJ, $n=3$. (g) Immunofluorescence staining of RPL19 in Con, FA-Exo, and METTL3+FA-Exo groups. Scale bar: 100 μm . Quantification of RPL19 in tumor tissues using ImageJ, $n=3$. Data are presented as mean $\pm$ SEM. ns, not significant; **** $P<0.0001$

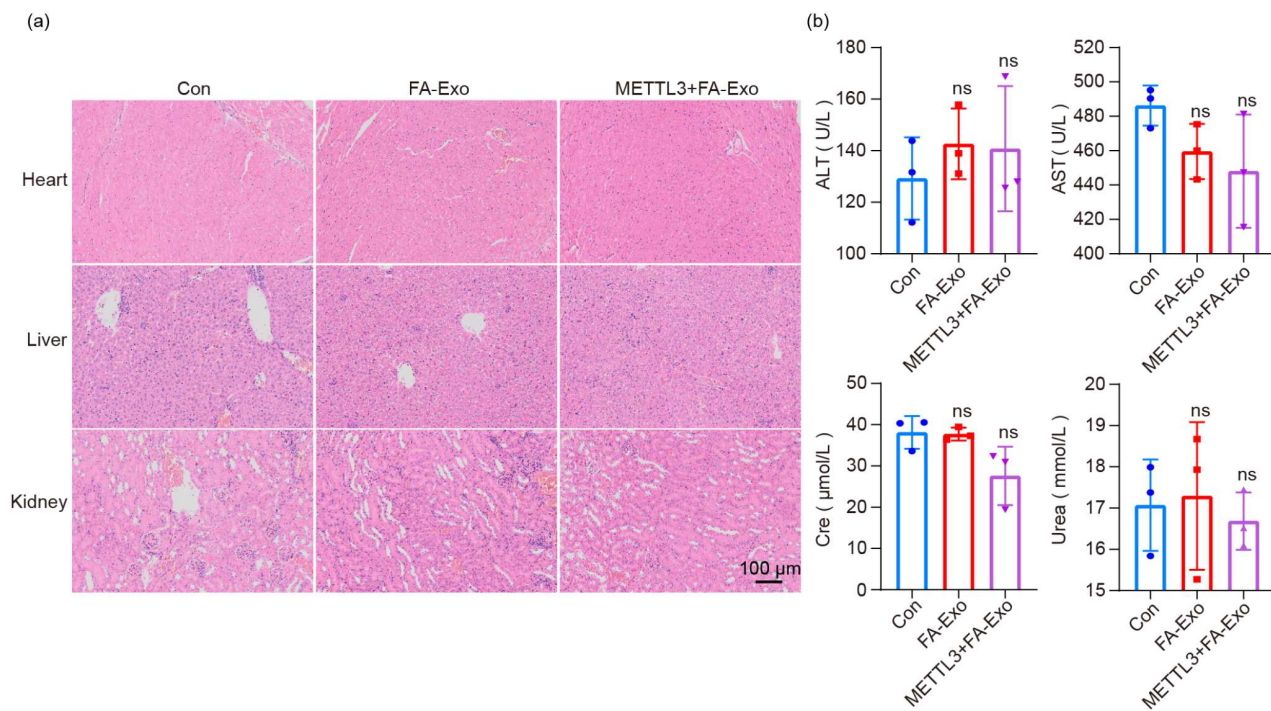


图 9 (网络版彩色)METTL3+FA-Exo的安全性评估. (a) 经对照组(PBS)、FA-Exo或METTL3+FA-Exo处理的小鼠心脏、肝脏及肾脏的H&E染色结果. 比例尺: 100 μm . (b) 经对照组、FA-Exo或METTL3+FA-Exo处理的小鼠血清生化参数(ALT、AS、Cre、Urea). 每组由 $n=5$ 只小鼠组成. ALT, 丙氨酸氨基转移酶; AST, 天冬氨酸转氨酶; Cre, 肌酐; Urea, 血尿素氮. ns, 无显著性差异

Figure 9 (Color online) The systematic toxicity assessment of METTL3+FA-Exo. (a) H&E staining of the heart, liver, and kidney from mice treated with Con (PBS), FA-Exo, or METTL3+FA-Exo. Scale bar: 100 μm . (b) Serum biochemical parameters (ALT, AST, Cre, Urea) from mice treated with Con, FA-Exo, or METTL3+FA-Exo. Each group includes $n=5$ mice. ALT, alanine aminotransferase; AST, aspartate aminotransferase; Cre, creatinine; Urea, blood urea nitrogen. ns, not significant

及翻译效率等环节, 调控基因表达及细胞命运. 我们的研究发现, 靶向 m^6A 相关调控因子, 尤其是METTL3, 有望成为治疗TNBC的有效策略. 体内外实验结果表明, METTL3过表达可显著抑制肿瘤的发生与生长. 结合MeRIP-seq与RIP-seq的联合分析进一步发现, METTL3通过 m^6A 依赖性机制促进RPL19 mRNA的降解, 从而抑制肿瘤进展.

尽管基因治疗在TNBC中的应用前景广阔, 但高效、安全的基因递送仍是临床转化的关键挑战. 主要难点在于如何实现对肿瘤组织的精准靶向, 同时避免载体在正常组织中的非特异性蓄积. 相比其他递送系统, Exo在基因递送中具有独特优势. 传统病毒载体虽能实现较高的转染效率, 但可能引发免疫反应并存在

基因组整合风险^[24,40,41], 非病毒载体(如脂质体、聚合物纳米颗粒等)虽可降低免疫原性, 却因体内清除快、特异性差而导致肿瘤靶向效率有限^[24,25,42].

相较之下, 外泌体具有优异的生物相容性和低免疫原性, 兼具天然的靶向能力与较高的载药效率, 是理想的基因递送平台. 更重要的是, 外泌体可稳定负载质粒并避免基因组整合, 从而降低潜在突变风险. 鉴于TNBC中叶酸受体高表达的特性, 本研究构建了以叶酸修饰的工程化外泌体(FA-Exo)为载体的递送系统. 该系统显著增强了METTL3在肿瘤组织中的富集与表达效率, 提升了基因治疗效果, 同时减少了对正常组织的非特异性损伤和全身毒性. 该研究为TNBC的安全、高效基因治疗提供了新的思路与技术途径.

参考文献

- Xiao Y, Xu Y, Wang H, et al. HEBP2-governed glutamine competition between tumor and macrophages dictates Immunotherapy efficacy in triple-negative breast cancer. *Cell Metab*, 2025, 37: 2030–2047.e7

- 2 Bianchini G, De Angelis C, Licata L, et al. Treatment landscape of triple-negative breast cancer — expanded options, evolving needs. *Nat Rev Clin Oncol*, 2022, 19: 91–113
- 3 Veronesi U, Boyle P, Goldhirsch A, et al. Breast cancer. *Lancet*, 2005, 365: 1727–1741
- 4 Leon-Ferre R A, Goetz M P. Advances in systemic therapies for triple negative breast cancer. *Br Med J*, 2023, 381: e071674
- 5 Harbeck N, Gnant M. Breast cancer. *Lancet*, 2017, 389: 1134–1150
- 6 Rinkenbaugh A L, Qi Y, Cai S, et al. An annotated biobank of triple-negative breast cancer patient-derived xenografts features treatment-naïve and longitudinal samples during neoadjuvant chemotherapy. *Cancer Res*, 2025, 85: 4062–4080
- 7 Nolan E, Lindeman G J, Visvader J E. Deciphering breast cancer: from biology to the clinic. *Cell*, 2023, 186: 1708–1728
- 8 Waks A G, Winer E P. Breast cancer treatment. *JAMA*, 2019, 321: 288–300
- 9 Dai Z, Lin B, Qin M, et al. METTL3-mediated m⁶A modification of SLC7A11 enhances nasopharyngeal carcinoma radioresistance by inhibiting ferroptosis. *Int J Biol Sci*, 2025, 21: 1837–1851
- 10 Boulias K, Greer E L. Biological roles of adenine methylation in RNA. *Nat Rev Genet*, 2023, 24: 143–160
- 11 Deng X, Qing Y, Horne D, et al. The roles and implications of RNA m⁶A modification in cancer. *Nat Rev Clin Oncol*, 2023, 20: 507–526
- 12 Zaccara S, Ries R J, Jaffrey S R. Reading, writing and erasing mRNA methylation. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2019, 20: 608–624
- 13 Huang H, Weng H, Chen J. m⁶A modification in coding and non-coding RNAs: roles and therapeutic implications in cancer. *Cancer Cell*, 2020, 37: 270–288
- 14 Chang G, Shi L, Ye Y, et al. YTHDF3 induces the translation of m⁶A-enriched gene transcripts to promote breast cancer brain metastasis. *Cancer Cell*, 2020, 38: 857–871.e7
- 15 Yankova E, Blackaby W, Albertella M, et al. Small-molecule inhibition of METTL3 as a strategy against myeloid leukaemia. *Nature*, 2021, 593: 597–601
- 16 Wang L, Dou X, Chen S, et al. YTHDF2 inhibition potentiates radiotherapy antitumor efficacy. *Cancer Cell*, 2023, 41: 1294–1308.e8
- 17 Su R, Dong L, Li Y, et al. Targeting FTO suppresses cancer stem cell maintenance and immune evasion. *Cancer Cell*, 2020, 38: 79–96.e11
- 18 Huang X, Zhang J, Cun Y, et al. Spatial control of m⁶A deposition on enhancer and promoter RNAs through co-acetylation of METTL3 and H3K27 on chromatin. *Mol Cell*, 2025, 85: 1349–1365.e10
- 19 Liu J, Eckert M A, Harada B T, et al. m⁶A mRNA methylation regulates AKT activity to promote the proliferation and tumorigenicity of endometrial cancer. *Nat Cell Biol*, 2018, 20: 1074–1083
- 20 Zhan L, Zhang J, Zhang J H, et al. METTL3 facilitates immunosurveillance by inhibiting YTHDF2-mediated NLRC5 mRNA degradation in endometrial cancer. *Biomark Res*, 2023, 11: 43
- 21 Li Y, Luo B, Lin X, et al. 20^R panaxatriol enhances METTL3-mediated m⁶A modification of STUB1 to inhibit autophagy and exert antitumor effects in triple-negative breast cancer cells. *Phytomedicine*, 2024, 130: 155537
- 22 He X, Li Y, Li J, et al. HDAC2-mediated METTL3 delactylation promotes DNA damage repair and chemotherapy resistance in triple-negative breast cancer. *Adv Sci*, 2025, 12: e2413121
- 23 Zhang G, Huang R, Zhao H, et al. ACAT1-mediated METTL3 acetylation inhibits cell migration and invasion in triple negative breast cancer. *Genes Immun*, 2023, 24: 99–107
- 24 Kim H I, Park J, Zhu Y, et al. Recent advances in extracellular vesicles for therapeutic cargo delivery. *Exp Mol Med*, 2024, 56: 836–849
- 25 Cheng L, Hill A F. Therapeutically harnessing extracellular vesicles. *Nat Rev Drug Discov*, 2022, 21: 379–399
- 26 van Niel G, Carter D R F, Clayton A, et al. Challenges and directions in studying cell-cell communication by extracellular vesicles. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2022, 23: 369–382
- 27 Wang L, Chen H, Qiu H, et al. Exosomes/MoS₂ complex for targeting and effective photothermal therapy. *J Nanobiotechnol*, 2025, 23: 613
- 28 Lin Q, Qu M, Zhou B, et al. Exosome-like nanoplatfrom modified with targeting ligand improves anti-cancer and anti-inflammation effects of imperialine. *J Control Release*, 2019, 311–312: 104–116
- 29 Yan F, Zhong Z, Wang Y, et al. Exosome-based biomimetic nanoparticles targeted to inflamed joints for enhanced treatment of rheumatoid arthritis. *J Nanobiotechnol*, 2020, 18: 115
- 30 Cheung A, Opzoomer J, Ilieva K M, et al. Anti-folate receptor alpha-directed antibody therapies restrict the growth of triple-negative breast cancer. *Clin Cancer Res*, 2018, 24: 5098–5111
- 31 Necela B M, Crozier J A, Andorfer C A, et al. Correction: folate receptor- α (FOLR1) expression and function in triple negative tumors. *PLoS One*, 2015, 10: e0127133
- 32 Li Y, Wang P, Zou Z, et al. Ginsenoside (20S)-protopanaxatriol induces non-protective autophagy and apoptosis by inhibiting Akt/mTOR signaling pathway in triple-negative breast cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 2021, 583: 184–191
- 33 Danaei M, Dehghankhold M, Ataei S, et al. Impact of particle size and polydispersity index on the clinical applications of lipidic nanocarrier systems. *Pharmaceutics*, 2018, 10: 57

- 34 Jain A, Barge A, Parris C N. Combination strategies with PARP inhibitors in BRCA-mutated triple-negative breast cancer: overcoming resistance mechanisms. *Oncogene*, 2025, 44: 193–207
- 35 Garrido-Castro A C, Lin N U, Polyak K. Insights into molecular classifications of triple-negative breast cancer: improving patient selection for treatment. *Cancer Discov*, 2019, 9: 176–198
- 36 Liao C, Zhang Y, Fan C, et al. Identification of BBOX1 as a therapeutic target in triple-negative breast cancer. *Cancer Discov*, 2020, 10: 1706–1721
- 37 Cai Y, Du J, Wang H, et al. KPNA2 silencing sensitizes triple-negative breast cancer to chemotherapy by promoting multipolar division and suppressing DNA damage repair. *Oncogene*, 2025, 44: 4254–4270
- 38 Lorentzen C L, Haanen J B, Met Ö, et al. Clinical advances and ongoing trials of mRNA vaccines for cancer treatment. *Lancet Oncol*, 2022, 23: e450–e458
- 39 Jin H, Wang L, Bernards R. Rational combinations of targeted cancer therapies: background, advances and challenges. *Nat Rev Drug Discov*, 2023, 22: 213–234
- 40 Herrmann I K, Wood M J A, Fuhrmann G. Extracellular vesicles as a next-generation drug delivery platform. *Nat Nanotechnol*, 2021, 16: 748–759
- 41 Shi J, Ma Y, Zhu J, et al. A review on electroporation-based intracellular delivery. *Molecules*, 2018, 23: 3044
- 42 Raguram A, Banskota S, Liu D R. Therapeutic *in vivo* delivery of gene editing agents. *Cell*, 2022, 185: 2806–2827

补充材料

图S1 Exo、FA-Exo、METTL3+Exo与METTL3+FA-Exo的表征

图S2 TNBC细胞中METTL3蛋白表达的蛋白质印迹分析

图S3 MeRIP-seq明确METTL3+FA-Exo治疗TNBC的潜在作用靶点

本文以上补充材料见网络版csb.scichina.com. 补充材料为作者提供的原始数据, 作者对其学术质量和内容负责.

Summary for “工程化外泌体通过m⁶A调控的RPL19 mRNA稳定性实现恶性肿瘤精准基因治疗”

Engineered vesicular system modulates m⁶A-dependent RNA stability for precision gene therapy of malignant tumors

Yan Li^{1,2,3,4†}, Bingjie Luo^{5†}, Suifang Chen^{6†}, Xiaodong Chu³, Jiayi Zou⁶, Lingyu Li^{5,7}, Yuling Zhang³, Lizhu Lin^{1,8*}, Ronghua Zhang^{9,10*} & Panpan Wang^{4*}

¹ The First Affiliated Hospital of Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510405, China

² Postdoctoral Research Station of Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510405, China

³ Cancer Research Institute, Jinan University, Guangzhou 510630, China

⁴ The First Affiliated Hospital of Jinan University, Jinan University, Guangzhou 510630, China

⁵ College of Pharmacy, Jinan University, Guangzhou 510630, China

⁶ The First School of Clinical Medicine, Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510405, China

⁷ Guangdong Provincial Key Laboratory of Traditional Chinese Medicine Informatization, Guangzhou 510630, China

⁸ Guangdong Clinical Research Academy of Chinese Medicine, Guangzhou 510006, China

⁹ College of Traditional Chinese Medicine, Jinan University, Guangzhou 510630, China

¹⁰ Institute of Traditional Chinese Medicine and Health, Jinan University, Guangzhou 510630, China

† Equally contributed to this work

* Corresponding authors, E-mail: gzuclmlnz@163.com; tzrh@jnu.edu.cn; wangpp@jnu.edu.cn

Triple negative breast cancer (TNBC) is characterized by the absence of estrogen receptor (ER), progesterone receptor (PR), and human epidermal growth factor receptor 2 (HER2), accounting for up to 15% of all breast cancer cases. TNBC is known for its aggressive nature, high metastatic potential, and poor prognosis. Currently, there are no targeted therapies available for TNBC, and chemotherapy, particularly with agents like paclitaxel, remains the standard treatment option. However, treatment failure is common due to the development of acquired or intrinsic resistance. This underscores the urgent need to explore more effective therapeutic strategies.

m⁶A is the most prevalent internal modification in eukaryotic mRNA and plays a crucial role in various aspects of RNA metabolism, including mRNA expression, splicing, nuclear export, and stability. Due to its significant regulatory impact on gene expression and cellular function, the dynamic balance of m⁶A methylation is tightly controlled, and disruptions in this balance can lead to various diseases, including cancer. The biological abundance and functions of m⁶A on RNA are determined by the dynamic interplay between methyltransferases (writers), demethylases (erasers), and m⁶A-binding proteins (readers). Dysregulation of m⁶A modulators has been shown to act as oncogenes or tumor suppressors, playing a critical role in cancer initiation, progression, metastasis, metabolism, and immune evasion within the tumor microenvironment. Methyltransferase-like 3 (METTL3) is a key enzyme in m⁶A methylation, forming a methyltransferase complex with methyltransferase-like 14 (METTL14) and WT1-associated protein (WTAP) that is responsible for m⁶A deposition on mRNA. In endometrial cancer, METTL3 has been reported to exhibit tumor-suppressive effects. Our previous studies also demonstrated that low METTL3 expression is associated with poor prognosis in TNBC patients. Small molecule drugs and viral vectors have been developed to promote METTL3 expression and restore methylation balance, thereby inhibiting TNBC progression. However, despite some progress, these therapeutic approaches are limited in clinical trials due to poor selectivity, low tumor-targeting capability, and associated systemic toxicity and immunogenicity. There is an urgent need for a delivery system that enhances safety and efficiency to improve the therapeutic outcomes of m⁶A modulator-based strategies.

Exosome (Exo) have emerged as promising targeted drug delivery carriers in gene therapy due to their unique biocompatibility, deep tissue penetration, and versatile cargo capacity. However, following systemic administration, Exo tend to accumulate rapidly in the liver and spleen, limiting their ability to selectively target specific organs and tissues. Additionally, extensive research has shown that folate receptors are highly expressed in high-grade TNBC and residual tumors after chemotherapy, making them potential therapeutic targets for drug delivery in TNBC. To address these challenges, we functionalized Exo with N-hydroxysuccinimide-polyethylene glycol-folic acid (NHS-PEG-FA), enhancing their ability to target TNBC tumor tissue. This modification not only increases drug accumulation in tumors but also reduces off-target effects, thereby improving therapeutic efficacy.

Here, we constructed engineered NHS-PEG-FA functionalized Exo for the targeted delivery of METTL3 cDNA plasmids, aiming to treat TNBC through epigenetic regulation of RPL19 mRNA. The NHS-PEG-FA modification significantly improved the tumor-targeting efficiency of the FA-Exo, enabling the precise delivery of METTL3 to tumor sites. By overexpressing METTL3, these engineered Exo increased the m⁶A methylation level of RPL19 mRNA in a METTL3-dependent manner, thereby promoting mRNA degradation and inhibiting tumor progression. This study presents an effective and low-toxicity strategy for the targeted delivery of METTL3, highlighting the potential of epigenetic regulation as a therapeutic approach in cancer treatment.

triple negative breast cancer (TNBC), m⁶A RNA methylation, methyltransferase-like 3 (METTL3), extracellular vesicles, folic acid-functionalized vesicles

doi: [10.1360/CSB-2025-5862](https://doi.org/10.1360/CSB-2025-5862)