

干细胞外泌体用于缺血性疾病治疗的研究进展

乔树雅, 田田*

(南京医科大学基础医学院神经生物学系, 江苏 南京 211166)

[摘要] 缺血性疾病是致人死亡或残疾的主要原因之一, 多种临床不良事件均可导致缺血后损伤, 如心肌梗死、缺血性脑卒中、实体器官移植和失血性休克等。间充质干细胞具有多向分化潜能, 其分泌的外泌体含有干细胞释放的多种治疗性生物因子, 能够诱导再生、抑制细胞凋亡以及调节免疫反应; 外泌体尺寸仅为纳米级别, 能够通过血液循环到达远端靶器官, 且外泌体表面的膜蛋白使其具备靶向能力, 对于多种形式的器官或组织损伤均有一定的恢复作用。基于以上优势, 干细胞外泌体引起了学界的广泛关注, 近年来使用外泌体治疗缺血后组织损伤的相关研究也逐渐增加。综述了干细胞外泌体生物发生的机制与自身性质, 以及干细胞外泌体用于缺血性疾病治疗的研究进展, 并讨论了干细胞外泌体临床应用面临的挑战。

[关键词] 间充质干细胞; 外泌体; 细胞外囊泡; 缺血性疾病

[中图分类号] Q463

[文献标志码] A

[文章编号] 1001-5094 (2023) 11-0817-12

DOI: 10.20053/j.issn1001-5094.2023.11.003

Research Progress of Stem Cell-derived Exosomes in the Treatment of Ischemic Diseases

QIAO Shuya, TIAN Tian

(Neurobiology Department, School of Basic Medical Sciences, Nanjing Medical University, Nanjing 211166, China)

[Abstract] Ischemic disease is one of the main causes of death or disability. Many clinical adverse events can lead to ischemic injury, such as myocardial infarction, ischemic stroke, solid organ transplantation and hemorrhagic shock. Mesenchymal stem cells have multidifferentiation potential, and the exosomes secreted by mesenchymal stem cells contain various therapeutic biological factors, which can promote regeneration, suppress apoptosis, and regulate immune response. The nanoscale size of exosomes enables them to target remote organs through blood circulation, and the membrane proteins on the surface of exosomes confer targeting ability that facilitates recovery from various organ or tissue damage. Based on the above advantages, stem cell exosomes have attracted extensive attention in the academic community. Research interest in the use of exosomes for ischemic tissue damage treatment has been growing in recent years. This article reviews the biogenesis mechanism and properties of exosomes derived from stem cells. Additionally, it reports the research progress in the use of stem cell exosomes for the treatment of ischemic diseases, and discusses the challenges in the clinical application of stem cell exosomes.

[Key words] mesenchymal stem cell; exosome; extracellular vesicle; ischemic disease

1 引言

缺血导致的组织损伤在临床上危险性极大, 其可引起各种类型疾病。当血流长时间中断或明显减少时会诱发组织损伤和器官的功能障碍, 引起局部组织氧气、葡萄糖以及其他代谢物质的缺失, 从而导致细胞的 pH 值、抗氧化水平以及酶活力降低; 同时会增加能量消耗并且引起代偿代谢途径 (如糖酵解) 的激活, 使细胞内的酸产生增加, 引起细胞损伤。并且缺血还可以通过影响细胞骨架、破坏细

胞膜完整性、破坏细胞内铁转运系统来诱发细胞的结构性损伤^[1-2]。在随后的再灌注过程中, 新鲜血液经侧支循环流入缺血组织带来氧气, 然而由于前期的缺血过程使抗氧化剂浓度降低, 导致超氧化物 (ROS) 的产生增加, 诱导氧化应激, 导致内皮功能障碍、DNA 损伤和局部炎症反应激活, 带来继发性损伤^[3]。当炎症进一步加剧, 会扩散到其他器官, 导致全身炎症反应综合征 (SIRS) 或引起多器官功能障碍 (MOD)^[4-5]。

间充质干细胞是一种多能干细胞, 具有多向分化的潜能, 能够归巢到受损组织并发生分化, 同时发挥免疫调节作用, 在再生医学领域具有重要应用价值。通过不同的提取手段可以在骨髓、脂肪、脐

接受日期: 2023-09-08

* 通信作者: 田田, 副教授;

研究方向: 干细胞外泌体与组织修复;

Tel: 025-86869432; E-mail: ttian@njmu.edu.cn

带、胚胎或其他组织中获得不同类型的间充质干细胞。在传统的细胞治疗中, 细胞的批量分离存储和运输是一项挑战, 并且在体内大规模使用细胞产品会导致一定几率的免疫排斥、细胞生存和功能受限, 并且可能会引起肿瘤发生。

研究表明, 干细胞的这种组织修复作用可能主要来源于其旁分泌活性。而作为干细胞的主要旁分泌成分, 干细胞分泌的外泌体能够克服大部分干细胞的应用限制^[6]。外泌体是一种由细胞分泌的直径为 40~200 nm 的微小囊泡, 具有与细胞膜相似的脂质双分子层, 在电镜下呈现杯盏状结构^[3]。已有研究证明, 损伤细胞分泌的外泌体可以通过释放生物活性分子来促进组织的修复^[7-8]。间充质干细胞因其旁分泌机制发挥治疗作用, 因此成为再生领域中研究最为广泛的外泌体细胞源。干细胞分泌的外泌体可以修复因缺血再灌注造成损伤的部位, 是缺血再灌注损伤治疗中最有前途的策略之一。除此之外, 外泌体还具有良好的生物安全性以及组织相容性, 并且作为一种生物分子, 它可以携带蛋白质、碳水化合物、脂质、信使 RNA (mRNA) 和微小 RNA (microRNA, miRNA) 以及一些小分子药物, 与靶器官相互作用, 引起一系列生物反应, 甚至能够穿透血脑屏障 (BBB)^[9]。作为干细胞的分泌组分, 外泌体在收集、储存和运输方面比干细胞更为方便快捷, 其能够在常规冷冻过程中保持稳定, 并且同一批干细胞能收集多次外泌体。由此可见, 外泌体在临床研究中有不可忽视的应用潜力。

2 干细胞外泌体的产生与性质

外泌体在生物科学领域具有独特的优势。作为一种细胞内以及细胞间的通讯介质, 外泌体内部包裹的内容物可以向外部传递信号, 从而调节远端细胞的生理病理情况, 参与多种疾病的进展过程。由于所有真核细胞均可生产外泌体, 其可存在于体液中, 如血浆、血清、羊水、母乳、尿液等^[10], 因此外泌体同样可以作为疾病初步诊断以及判断是否痊愈的生物标志物。

2.1 外泌体的生物发生

外泌体的形成主要经过 3 个阶段, 首先细胞膜

向内凹陷, 形成内吞小体, 多个内吞小体互相融合后汇聚成早期核内体; 早期核内体进一步凹陷, 包裹入细胞内物质, 形成多个腔内小囊泡, 转变为晚期核内体, 也称为多泡体; 最后, 多泡体与细胞质膜融合, 腔内小囊泡被释放到细胞外, 这种释放到细胞外的腔内小囊泡就是外泌体^[10]。外泌体内部可包裹多种物质, 如蛋白、核酸、脂质、生物代谢物等, 细胞来源不同, 内部包裹的物质不同, 带来的作用也不同^[11]。如肿瘤易感基因 101 (TSG101) 蛋白、热休克蛋白 70 (HSP70)、CD81、CD63 等蛋白成分, 通常可以用作外泌体的特异生物标志物; 而四次跨膜蛋白如 CD9、CD63、CD81、CD82 可以协助外泌体参与细胞的穿透、侵袭和融合过程; HSP70、HSP90 可以参与抗原的呈递与结合; 多泡体 (multivesicular body, MVB) 形成蛋白如 ALG-2 相互作用蛋白-X (Alix)、脂筏标记蛋白和 TSG101 蛋白参与到外泌体的形成和释放过程中^[12]。此外, 外泌体中的核酸成分也发挥着重要的作用, DNA 或 RNA 在外泌体的形成过程中进入膜内, 通过运输作用可以改变远端细胞的基因表达情况。其中 miRNA 是外泌体中含量最丰富的一种核酸物质, 能够影响多种生物调节过程, 包括胞外分泌、造血、血管形成以及细胞间通讯等^[13]。

2.2 外泌体的分离

由于外泌体通常存在于体液中, 选择合适的分离方法是至关重要的, 这常常影响到外泌体的含量以及有效性。基于外泌体的粒径、密度、形态、表面标志蛋白等特性, 研究人员开发了多种外泌体分离方法, 如差速离心法、超速离心法、聚合物共沉淀法、体积排阻色谱法、密度梯度离心法、磁珠捕获法和免疫亲和法等。

超速离心法是应用最广泛的一种外泌体分离方法, 也被称为外泌体提取和分离的金标准, 目前有超过 80% 的研究人员采用该方法提取分离外泌体^[14]。此方法因操作简便、无需标记外泌体、可以避免交叉污染、技术成熟而成为外泌体分离的首选方法。但该方法同时也存在一定的缺陷, 如纯度低、损失高、耗时较长、易引起外泌体聚集, 并且可能造成外泌体损伤^[15]。密度梯度离心法相较于超速离心法精确

度更高, 通常与其结合使用。使用此方法需要事先配制好梯度密度的液体介质, 如蔗糖、碘克沙醇等, 将样品置于介质顶部, 经过长时间离心后, 外泌体样品会停留在与之密度相似的介质层面, 一般介于 $1\ 100\sim 1\ 180\ \text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ^[15]。此方法获得的外泌体样品几乎不含杂蛋白, 纯度较高, 但与超速离心法类似, 仍可能造成外泌体的损伤与聚集。

免疫亲和法是基于外泌体表面特定表达的高丰度蛋白(如四次跨膜蛋白、Alix、HSP70等)^[15], 设计出对应抗体与之结合, 从而实现外泌体的分离与富集。此方法获得的外泌体样品特异性好、提取效率高、耗时少, 但外泌体分离时所用到的抗体对外泌体本身的生物活性是否有影响还需要进一步探讨。聚合物共沉淀法是通过降低外泌体在悬浮液中的溶解度, 再通过低速离心收集沉淀以达到分离效果。常用的聚合物是聚乙二醇(PEG), 这是一种高度亲水的聚合物, 能够与外泌体周围的水分子相互作用, 形成疏水微环境, 引起外泌体沉淀。该方法由于操作简便、收集效率高, 目前已被广泛用于各种类型的样本收集。但由于纯度低、检测中可能产生假阳性结果、聚合物难以去除等缺点, 不利于后续的实验分析^[15]。除以上几种方法外, 常用的外泌体分离方法还有超滤法、尺寸排阻色谱柱法等。

2.3 干细胞外泌体的蛋白成分

作为干细胞的关键旁分泌成分, 干细胞分泌的外泌体能够通过模拟干细胞多分化特性、诱导再生表型、抑制细胞凋亡和调节免疫反应来促进组织损伤后的修复。在各种病理生理条件下, 干细胞外泌体能够诱导受体细胞的表型变化, 并与受体组织建立功能联系。例如, 骨髓间充质干细胞(BMSC)能够刺激真皮修复和再生, 其分泌的外泌体内部装载有促细胞增殖的蛋白 Wnt3a, 将这种蛋白转运到受体细胞后能够促进成纤维细胞的增殖、迁移以及血管形成^[16]。过表达 CD47 和 CD100 的外泌体能够帮助外泌体逃脱吞噬作用, 提高外泌体在体内的停留时间, 而携带 TAT 肽的外泌体经过这种修饰后能够靶向细胞进入细胞核, 诱导小鼠癌细胞的凋亡^[1]。此外, 外泌体通过递送 CD73 蛋白, 激活软骨细胞内的蛋白激酶 B (Akt) 和细胞外调节蛋白激酶 (ERK)

信号通路, 调节巨噬细胞极化, 减少促炎因子分泌, 提高软骨细胞活力, 促进损伤软骨的修复^[17]。来源于尿液干细胞的外泌体能够携带促血管生成蛋白 DMBT1, 促进糖尿病模型小鼠中的血管生成以及伤口愈合^[18]。

2.4 干细胞外泌体的核酸成分

作为细胞间通讯的介质, 外泌体虽然尺寸仅为纳米级别, 但其内部包裹的丰富核酸、蛋白与脂质等活性分子可以随外泌体输送至身体各部位, 对神经系统、呼吸系统、循环系统、消化系统、泌尿系统等不同系统的各种疾病均具有良好的治疗效果。而间充质干细胞来源的外泌体因其潜在的“再生”功能受到了广泛的关注。许多研究表明, 干细胞来源的外泌体在各种体内与体外模型中具有修复、抗氧化、抗炎、抗衰老、促进伤口愈合等作用, 并且其安全性较高, 作为间充质干细胞的替代品, 在无细胞疗法的应用中受到了广泛关注。

2007年, Valadi等^[19]首次注意到外泌体能够参与细胞间 mRNA 和 miRNA 的交换, 干细胞外泌体内部包裹有干细胞相关转录因子 mRNA, 如 Nanog、Oct4、HoxB4 和 Rex-1, 有助于干细胞维持相关特性^[20]。此外, 干细胞外泌体携带的 Wnt3^[20]、Hedgehog^[21] 等干细胞特异性效应分子, 能够支持成体干细胞的自我更新、分化以及迁移。细胞增殖、新生血管形成和神经再生是受损组织愈合的关键指征, 临床前研究表明, 干细胞外泌体可以诱导再生表型, 参与受损组织的修复。例如, 胚胎干细胞来源的外泌体通过运输 miR-294 保护心肌祖细胞, 并促进心肌梗死模型小鼠的细胞增殖, 改善心肌功能^[22]。脐带间充质干细胞的外泌体通过 miR-181c 抑制 TLR4 通路, 降低炎性因子表达, 缓解烧伤后的炎症反应^[23]; 人类造血干细胞分泌的外泌体中含有 miR-126-3p, 其转运入血管内皮细胞, 能够调节生长因子、血管生成素、基质蛋白酶的表达, 改善后肢缺血模型小鼠的血管密度, 改善后肢运动功能^[24]。负载 miR-133b 的大鼠骨髓干细胞外泌体可用于大鼠脑卒中后的神经恢复^[25]。干细胞外泌体中的 miR-223 能够调节巨噬细胞极化, 促进皮肤伤口愈合^[26]。

3 干细胞外泌体在缺血性疾病治疗中的应用

缺血再灌注损伤包括两个相互关联的阶段: 初始缺血阶段, 即器官的血供突然中断, 随后是血流恢复再灌注阶段。在缺血阶段, 血流突然受阻, 会导致细胞内的 pH 和 ATP 水平降低, 为弥补这一过程中的能量和氧气浓度的降低, 细胞会暂时从有氧呼吸切换到无氧呼吸, 同时激活糖酵解, 这一过程会产生大量的乳酸和细胞毒性物质, 并且低氧环境下 ATP 的生产效率低下, 导致酶活力下降, 其中细胞内的钙 ATP 酶的功能障碍会导致细胞内钙过载, 最终导致内质网以及线粒体的功能障碍, 引起细胞肿胀^[27]。此外, 长时间的缺氧会影响细胞的膜电位, 进一步影响细胞骨架以及细胞内部的离子分布, 若治疗不及时将会引起不可逆转的损伤。

缺血后的再灌注过程同样可能会导致组织细胞损伤, 血流恢复后, 游离氧之间的相互作用会形成 ROS, 介导线粒体和细胞膜的过氧化, 诱导内皮细胞水肿并渗透到细胞内的蛋白质和小分子物质中^[28]。此外, ROS 还能与一氧化氮 (NO) 相互作用, 使其血管舒张功能消失, 形成剧毒剂过氧亚硝酸盐。血流的恢复同时可以使血管收缩剂内皮素和血栓素 A2 的产生增加, 而血管扩张剂前列腺素 I₂ 的产生减少, 使微循环恢复延迟^[29]。此外, 血流的再灌注可能会引发强烈的炎症反应, 导致炎症细胞的聚集, 激活受损细胞的补体途径以及细胞的程序性死亡^[30], 促进巨噬细胞释放炎症细胞因子, 进一步加剧炎症和细胞死亡。

3.1 心肌缺血

心肌缺血是指由于心脏血流灌注减少导致供氧不足, 引起心脏代谢紊乱的一种病理状态, 有着极高的发病率与死亡率, 对人类健康具有很大威胁, 并且由于心肌细胞的增殖能力相较于其他细胞来说比较弱, 损伤后无法实现完全的自我修复, 目前临床对于心肌缺血的治疗方法主要有药物治疗 (溶栓药物、降低心脏耗氧量药物等)、介入治疗 (冠状动脉扩张术、支架置入术等)、心脏搭桥手术等^[31-32]。临床前研究表明, 干细胞外泌体在治疗心肌缺血方面具有广阔的应用前景。外泌体由于其无创、排异性小等优势, 能够在体内运输各种分子, 其中 miRNA 含量

最为丰富。外泌体被其临近或远端细胞吸收后, 其内部的 miRNA 在基因表达后的转录调节中发挥了重要的作用, 具有促血管生成、抗炎、抗氧化等优点, 对于受损心脏具有保护和再生的功能, 有望成为新兴的心肌缺血治疗手段。

有研究表明小鼠诱导多能干细胞分泌的外泌体富含促进血管生成以及具有细胞保护作用的 miRNA 和蛋白质, 能够增强小鼠心脏内皮细胞的血管生成、迁移和抗凋亡特性, 促进缺血后的心脏修复^[8]。同样的现象也存在于胚胎干细胞中, 来自胚胎干细胞的外泌体同样对于缺血后的心肌有修复作用, 能够增强心脏功能、提高心肌细胞存活率, 减少梗死后纤维化的形成^[22]。外泌体内富含 miRNA, 在外泌体递送的同时实现 miRNA 的传递。有研究人员发现, 间充质干细胞来源的外泌体其内部包含关键因子 miR-210, 其在体外能够介导内皮细胞的增殖和迁移, 使该外泌体在体内具备了促血管生成作用, 因而能够改善缺血后心肌的恢复^[33]。此外, 有研究已经证实, 缺氧诱导下间充质干细胞内 miR-486-5p 表达上调, 能够保护心肌细胞, 减少因缺血再灌注损伤导致的细胞凋亡, 减小心肌梗死体积等^[34]; 而缺氧诱导下的小鼠骨髓间充质干细胞的外泌体富含 miR-125b, 能够抑制心肌细胞中促凋亡基因 *p53* 和 *BAK1* 的表达, 介导心脏保护作用, 并且在外泌体表面偶联缺血心肌靶向肽后, 外泌体能够通过静脉注射到达心脏。用 miR-146a 修饰的脂肪间充质干细胞的外泌体, 可通过抑制早期生长反应因子 1 (EGR1) 表达来抑制心肌梗死诱导的细胞凋亡、炎症和纤维化^[35]。miR-126 能够提高细胞存活率, 改善心脏功能^[36]; 而 miR-182 能够调节巨噬细胞极化情况, 降低心脏炎症水平^[37]。外泌体 miRNA 在心血管疾病中发挥着重要的作用, 这些分子广泛参与心血管疾病的发生发展, 因而外泌体有望成为心血管疾病的诊断治疗新工具。

3.2 神经系统缺血

脑卒中是脑部血管突然破裂或阻塞引起血流供应中断的一种常见疾病, 有一定几率致人残疾或死亡。由于神经元的非复制性和血脑屏障的存在, 神经系统缺血很难治疗, 迫切需要寻找能够治疗缺血

后的神经元损伤的具体方法以及新型药物。脑卒中的主要治疗目标是促进脑内皮细胞和脑实质细胞的重塑,在多项临床前研究中,干细胞分泌的外泌体都起到了良好的治疗作用^[38]。外泌体的一个重要特性是能够穿透血脑屏障,这使其具有治疗神经系统疾病的潜力。并且干细胞具有自我更新优势,其分泌的外泌体具有调节神经系统微环境,促进其自我修复的功能,在神经系统缺血中发挥着重要的作用。例如,有研究者发现在大鼠中动脉闭塞诱导的大鼠脑卒中模型中,静脉输入骨髓间充质干细胞来源的外泌体能够通过过表达 miR-17-92 激活磷脂酰肌醇 3 激酶 (PI3K)-Akt-哺乳动物雷帕霉素靶蛋白 (mTOR)-糖原合成酶激酶-3 β (GSK-3 β) 信号通路,促进少突胶质细胞的发生,增加神经可塑性,促进神经功能的恢复^[39]。人类神经干细胞来源的细胞外囊泡具有的神经保护作用能够促进脑卒中小鼠的组织恢复,改善感觉与运动功能。对于大型动物来说,这种外泌体能够有效消减猪脑卒中后的颅内出血症状,减少脑病变的发生和脑肿胀的体积,并且能够保留脑白质完整性,行为和活动能力也有显著恢复^[38]。此外,人脂肪来源的间充质干细胞能够促进创伤性脑损伤后的恢复,通过增加神经元数量、减少炎症使神经元再生,改善感觉、认知等功能^[40]。间充质干细胞分泌的外泌体能够促进脑卒中后的功能性神经恢复以及促进脑组织重塑^[10],而缺氧诱导后的间充质干细胞,其分泌的外泌体能够促进微血管重塑^[41],对脑卒中后的恢复起到积极作用。此外,外泌体还能够通过调节小胶质细胞的极化、调节细胞周期、促进线粒体自噬来减轻脑缺血再灌注后的神经炎症和缓解神经元焦亡^[10]。

目前对于外泌体修复神经系统缺血的作用和机制研究主要集中于 miRNA。例如,已有研究表明 miR-210 是缺氧诱导后产生的主要 miRNA,能够通过激活血管内皮生长因子 (VEGF) 信号通路介导新生血管的产生。研究者在骨髓来源的间充质干细胞分泌的外泌体表面偶联 RGDyK 环肽,并在外泌体内部装载胆固醇修饰的 miR-210,发现这种改造后的外泌体能够使脑缺血再灌注小鼠病变区域的 VEGF 表达增加,促进血管生成,增加小鼠存活率^[42]。

此外,干细胞外泌体中的 miR-542-3p 能够通过抑制 Toll 样受体 4 (TLR4) 的活性来减轻缺血诱导的神经胶质炎症,miR-124 可通过靶向 USP14 减轻缺血再灌注导致的脑损伤并提高神经元存活率^[35]。

3.3 肺缺血

在实体器官移植中,肺移植因具有高风险性,病人术后早期死亡率很高。据报道,原发性移植功能障碍主要由闭塞性支气管炎综合征引起,且目前临床上主要用于治疗肺部缺血再灌注损伤的手段仅为体外维持氧合^[43]。已有研究证明,间充质干细胞来源的外泌体具有免疫调节能力,能够通过减少促炎细胞因子以及中心粒细胞的浸润,调节巨噬细胞极化,从而减轻肺部炎症。同时,其能够减少细胞凋亡,促进表面活性物质的合成,刺激肺泡上皮再生。此外,该类外泌体能够增强内皮细胞之间的链接,促进蛋白质的合成,使微血管通透性得到修复;还能够通过减少纤维蛋白的形成抑制肺部纤维化的产生^[44]。此外,在灌注液中添加间充质干细胞来源的外泌体能够减少炎症因子的产生,为离体灌注条件下的供体肺器官提供保护,减轻移植后的炎症反应,提高肺移植的成功率^[45]。

间充质干细胞外泌体中富含血管生成素 (Ang-1) 的 mRNA,其具备促进肺血管结构稳定以及改善肺部炎症的作用。研究表明骨髓间充质干细胞分泌的外泌体能够在体外维持内毒素刺激后的内皮细胞完整性,并且可以减少脂多糖诱导的肺损伤小鼠模型中的肺部炎症^[46]。间充质干细胞来源的外泌体通过传递 miR-206 靶向上皮细胞特异性趋化因子 CXCL1,从而减少中性粒细胞的浸润,减轻肺部炎症,缓解肺部缺血再灌注损伤^[47]。给高氧诱导下肺损伤的大鼠吸入人脐带血来源的间充质干细胞分泌的外泌体,结果显示外泌体可以介导血管 VEGF 的转移,从而对抗高氧诱导的肺损伤^[48]。此外,研究发现气管输入猪骨髓间充质干细胞来源的外泌体能够干扰各种流感病毒的血凝活性,抑制流感病毒的复制,缓解病毒诱导的肺上皮细胞凋亡,并且能减少促炎细胞因子的产生^[49]。并且间充质干细胞来源的外泌体还能够通过调节细胞骨架的信号转导来调节小鼠休克后的肺血管通透性^[50]。Chaubey 等^[51]证

明, 间充质干细胞外泌体可通过分泌肿瘤坏死因子 α 刺激基因-6蛋白(TSG-6)纠正高氧暴露下产生肺部炎症小鼠的肺动脉异常高压以及右心室肥厚, 减少脑细胞死亡以及髓鞘减退, 提示这种外泌体或可用于相关疾病的治疗。

3.4 肝缺血

原位肝移植是肝病终末期和恶性肝肿瘤患者最有效的治疗方法, 然而, 后续的移植肝细胞凋亡以及急性炎症级联反应可能会导致肝脏细胞以及非实质细胞的严重损伤, 肝脏血流急性中断后血流的再灌注会引起肝脏缺血再灌注损伤, 这是影响肝脏手术或肝脏移植成功率的关键因素。而间充质干细胞分泌的外泌体能够增强组织修复以及再生, 调节炎症免疫反应, 能够很好地代替干细胞的再生特性, 已有研究证明荧光标记的外泌体静脉输入小鼠体内后会优先迁移至肝脏部位, 并且在诱导损伤后外泌体聚集密度增加^[52], 证明在不同组织器官中肝脏更容易摄取大量外泌体, 因此输入外泌体相较于其他疗法具有显著的优势。Haga等^[52]研究发现, 给小鼠静脉输入间充质干细胞外泌体可显著降低肝缺血再灌注后的组织坏死程度, 降低血清转氨酶水平以及炎症因子表达, 提高趋化因子表达以及增加细胞活力, 即外泌体能够通过调节炎症反应来减轻肝损伤, 促进肝缺血再灌注后的恢复。干细胞外泌体中含有功能性线粒体, 这些线粒体被转移到肝脏内的中性粒细胞后能够诱发线粒体融合, 促进中性粒细胞内损伤线粒体的形态恢复以及功能再生, 抑制肝脏缺血再灌注损伤导致的中性粒细胞凋亡^[53]。Tamura等^[54]也发现静脉注射骨髓干细胞来源的外泌体能够通过调节免疫反应抑制化学药物诱导的肝脏损伤。

常温机械灌注是一种新兴的肝脏移植前保存手段, 但其有一定几率会导致肝脏缺氧, 诱发肝脏缺血再灌注损伤, 干细胞外泌体能够有效地弥补这种缺陷。例如, Rigo等^[55]给离体培养的肝脏灌注模型的灌注液中添加来自肝脏干细胞的外泌体, 发现其能够有效地被肝脏摄取, 并且能够减少收集的灌注液样本中丙氨酸氨基转移酶、乳酸脱氢酶的水平, 减少缺氧诱导下的肝脏损伤。在肝脏相关炎症

反应中, $CD4^+$ T细胞发挥着重要的作用。缺血后组织中 $CD4^+$ T细胞的聚集浸润会刺激免疫反应, 加重肝脏细胞的损伤。而脐带间充质干细胞来源的外泌体能够调节钙离子通道的活性, 减少 $CD4^+$ T细胞中CD154的合成表达, 减少肝缺血再灌注过程中的损伤^[56]。

3.5 肾缺血

由循环休克或麻醉手术引起的肾脏缺血后再灌注损伤是急性肾损伤的主要原因, 其主要特征是肾功能快速恶化与严重肾小管损伤, 由于成纤维细胞的增殖与细胞外基质的沉积, 随后可能发展为慢性肾脏病^[57], 因此, 抑制肾损伤引起的细胞凋亡是目前临床针对肾脏缺血再灌注损伤的主要研究方向。许多临床前研究已经表明干细胞外泌体对于肾脏疾病有治疗作用, 干细胞来源的外泌体已被证明可以通过抑制纤维化、炎症和细胞凋亡来修复缺血性肾损伤^[35]。例如, 有研究表明骨髓间充质干细胞来源的外泌体能够通过局部释放生长因子来增强细胞增殖, 进一步改善肾功能障碍, 并且能够修复肾小管损伤引起的急性肾损伤^[58]。研究人员给肾动脉狭窄模型猪输入脂肪间充质干细胞来源的外泌体, 发现外泌体与肾小管细胞、巨噬细胞有共定位, 表明其发生了内化融合。且外泌体的输入减轻了猪的肾脏炎症, 改善了肾髓质氧化和纤维化, 提高了肾血流量以及肾小球滤过率, 提示外泌体对于肾脏损伤有治疗作用^[59]。干细胞外泌体还能运输有治疗效果的miRNA靶向损伤的肾脏, 如miR-let7c能够改善肾脏结构, 抑制肾脏炎症, 缓解肾纤维化, 减少肾细胞损伤^[60]。人尿源干细胞(USC)释放的外泌体中含有miR-146a-5p, 能够靶向并降解白细胞介素-3受体相关激酶1(IRAK1)的mRNA, 抑制核因子(NF)- κ B信号通路, 减少体外缺氧诱导下人肾皮质近曲小管上皮细胞的损伤, 对肾脏细胞有保护功能^[35]。此外, 同样来源于USC外泌体的miR-216a-5p能够靶向磷酸酶和张力蛋白同系物(PTEN), 并通过Akt途径调节细胞凋亡, 减少肾脏缺血再灌注损伤^[61]。人脐带间充质干细胞来源的外泌体能够通过miR-53b-70p/p216途径抑制细胞凋亡, 促进肾小管修复^[35]。

针对肾脏的缺血再灌注损伤,研究人员已证明人诱导多能干细胞分泌的外泌体输入体内后能够与肾脏细胞相融合,向肾脏靶细胞递送特异蛋白SP1,激活细胞内鞘氨醇激酶1的表达进而抑制细胞的坏死性凋亡,减少肾脏的缺血再灌注损伤^[62]。

4 干细胞外泌体临床应用面临的挑战

干细胞外泌体疗法在再生医学领域已经取得了显著的成就,大量临床前研究为其在临床的转化应用奠定了基础。然而外泌体疗法在走向临床转化的道路上还面临着许多障碍,需要研究者针对不同的疾病选择合适的干细胞种类,优化干细胞的培养手段,提高外泌体的分离技术,使用外泌体运输不同种类的生物活性物质或小分子药物。

在目前的医学手段下,已经可以实现从骨髓、脂肪、脐带、胚胎、胎盘、羊水、血液、肝脏、皮肤和其他组织中分离干细胞,其中骨髓、脂肪、脐带、胚胎来源的干细胞相较于其他来源的干细胞而言目前研究最广泛,但想要真正实现干细胞外泌体的临床应用仍存在一些挑战。例如,骨髓干细胞获得难度大,体外扩增能力差,不利于外泌体的大规模生产;脂肪干细胞易于获得和增殖,自体脂肪移植在临床上已应用广泛,且免疫排斥反应小,但有一定的致癌风险;脐带干细胞难以获得伦理许可。相较于以上几种,胎盘干细胞由于其与伦理争议无关,有强扩增性与低免疫原性,目前已出现大批脐带干细胞的商业细胞库,若能优化精简外泌体的提取分离步骤,可能会积极推动干细胞外泌体的临床应用。

4.1 外泌体的大规模生产

干细胞外泌体临床应用的主要障碍之一就是难以实现外泌体的大规模生产,来源于干细胞的外泌体受制于干细胞生长缓慢,难以获得足量外泌体,其生产、纯化和储存的效率比较低,并且来自不同组别、不同批次的间充质干细胞产生的外泌体质量难以保持一致,来自成人组织的间充质干细胞增殖能力有限,目前仍缺少公认的可应用于临床的外泌体大规模生产技术,研究人员提出的各种技术手段仍需要在临床前研究中得到广泛认可^[63]。原代干细胞由于其自身限制,并不能无限增殖,其增殖到一

定代数将会有成瘤风险,并且处于不同代数的干细胞以及不同的培养密度均有可能对外泌体产量产生影响,因此大规模培养干细胞用于收集外泌体比较困难。目前已知的可增加干细胞外泌体产量的方法有缺氧刺激、低血清培养、提高钙离子浓度等。此外,有研究者尝试使用携带MYC基因的慢病毒转染干细胞,实现干细胞的永生化,发现其能够基本模拟亲本的干细胞的生物特性,其生产的外泌体同样能够减少心肌缺血再灌注损伤小鼠模型的梗死面积,区别在于培养时细胞黏附性降低,生长速度提高以及衰老延迟,能够减少细胞生产时间以及降低细胞生产成本^[64]。

有研究报道过干细胞分泌的各种治疗因子在体外难以发挥真正作用,其主要原因可能为体内外细胞生长方式存在差别。其中自然状态下的干细胞为三维立体生长,彼此之间贴合紧密,而体外培养普遍采取平面培养,细胞为单层生长,无法达到体内类似的细胞累积程度,因此动态3D培养方法更具有优势,将干细胞接种于PEG水凝胶微孔阵列后,其能够自发地在圆柱形微孔中聚集,形成与体内微环境类似的3D聚集体,干细胞的表型和先天特性得到高度保留,外泌体的产量也相较于传统的平面培养大幅度提高^[65]。

此外,另一种大规模细胞培养方式为生物反应器,细胞接种于圆柱形中空纤维柱中,多根中空纤维柱聚集成束,外部包绕圆柱形外壳,培养基通过循环泵在纤维柱中流动。这种纤维柱比表面积极大,相较于传统的平面培养方法能够实现细胞的超高密度培养,收集的外泌体密度也比传统的平面培养高约4倍,外泌体的生物活性并不受影响,但培养基流动时产生的剪切应力可能对外泌体的尺寸以及有效物质的含量造成影响^[66],因此需要进一步的研究来减少这种不利影响,为外泌体的大规模收集增加可行性。

4.2 质量控制与标准化

为使外泌体在临床前和临床研究中获得可重复的结果,需要注意外泌体在生产过程中的质量控制和标准化,在外泌体生产过程中应严格排除微生物、内毒素和其他类型的细胞污染。此外,为了维持外泌体产品的均一性,生产过程中各项指标也应保持

一致, 包括亲本细胞的接种密度、细胞活力等, 培养基的选择以及保存运输中的温度和包装方式也应保持一致。

有研究者认为外泌体保存时应悬浮在磷酸盐缓冲溶液 (PBS) 中, 放置在 -80°C 冰箱, 然而外泌体的反复冻融可能会造成生物活性的下降甚至丧失, 暂时无法确定临床应用时的最佳保存标准, 需要进一步的研究来确定储存条件。

为控制获得的外泌体的质量, 需要对外泌体的理化参数、纯度以及标志物进行检测。其中理化参数的检验需要检测外泌体的粒径分布以及浓度, 国际细胞外囊泡学会 (ISEV) 已提出对于分离获得的外泌体需要从 3 个层面进行鉴定: 1) 蛋白免疫印迹法 (Western Blot, WB), 用于鉴定外泌体的表面标志物; 2) 透射电镜 (TEM), 用于鉴定外泌体的形态; 3) 纳米颗粒追踪分析 (NTA), 用于鉴定外泌体的尺寸^[67]。外泌体的表面富含参与外泌体运输的 4 次跨膜蛋白、热休克蛋白家族以及一些特异蛋白, 这些蛋白参与囊泡的形成和分泌过程, ISEV 建议普通鉴定时每次至少鉴定 3 种不同类别的外泌体阳性蛋白 (其中必须同时包括跨膜或脂质结合蛋白和胞质蛋白), 并且至少鉴定 1 种外泌体阴性蛋白 [如内质网标志蛋白——钙联蛋白 (calnexin) 等], 以保证外泌体样本的准确性。在电镜下观察外泌体的形貌以及粒径是最早的外泌体鉴定方法, 电镜下的外泌体呈现为大小不一, 粒径为 $40\sim 150\text{ nm}$ 、呈现凹陷的杯盏状结构, 能看见明显的膜边界。因此电镜观察是最直观的外泌体检测途径, 但该方法对于样品的要求较高, 制样较复杂。纳米颗粒追踪分析是利用光散射和布朗运动的特性获得液体悬浮液中的样本粒度分布, 能够对悬浮液中的颗粒进行全方位的表征, 分辨率高、检测速度快、准确度高。除此之外, 使用纳米流式细胞仪同样能够检测外泌体生物标志物, 基于瑞利散射以及鞘流单分子荧光检测原理, 能够实现外泌体样本的单颗粒检测。该法适合高通量外泌体筛选, 并且能够分析外泌体的颗粒大小^[68]。

外泌体的纯度检测方法, 大体上分为 3 类: 基于外泌体的物理性质, 通过检测样本的颗粒数与

总蛋白含量的比值来反映外泌体的纯度, 比值越高则纯度越高; 基于外泌体的膜结构, 通过膜染料 pH26/67、Cell Trace 等特异性染色直接观察, 或使用破膜剂 Triton X-100 破坏外泌体膜结构, 比较 Triton X-100 处理前后样品的颗粒数变化以计算外泌体的纯度, 减少的颗粒数占比越高则纯度越高; 基于具有生物活性的蛋白酶, 使用活细胞荧光染料羧基荧光素二醋酸琥珀酰亚胺脂 (CFSE) 对细胞进行染色, 该细胞分泌的外泌体将同样带有这种荧光信号, 其阳性率可反映外泌体的纯度^[68]。

4.3 人体安全性

干细胞作为研究热点, 是一种治疗各种难治性疾病的新技术, 干细胞移植被认为是再生医学中最有潜力的一种方法, 近期国际干细胞研究学会 (ISSCR) 发布了新版《干细胞研究和临床转化指南》^[69], 介绍了干细胞的胚胎模型、人类胚胎、嵌合体、类器官和基因组编辑相关的各类研究, 并且讨论了临床转化和相关应用的可行性, 促进了干细胞疗法的开发与临床使用。与此同时, 目前全球已有十多款干细胞相关产品陆续上市。然而, 干细胞存在的致瘤性、促炎性以及免疫排斥等风险是切实存在的, 这为干细胞的临床应用带来了巨大的挑战。已有研究证明干细胞的主要治疗作用来源于它的旁分泌作用, 外泌体作为主要分泌成分, 含有大量生物活性物质, 能够代替干细胞发挥组织器官修复作用, 并且, 与间充质干细胞相比, 外泌体的生物安全性更高。由于外泌体为细胞分泌物而非活体细胞, 植入体内后直接被靶细胞内化, 它能够提供与干细胞相似的治疗效果, 同时能够减少细胞疗法潜在的不良反应, 如不良免疫应答和细胞的恶性转化。由于外泌体储存较为简单, 与细胞疗法相比生产成本大大降低。近年来, 越来越多的公司将目光转移到外泌体这一领域, 纷纷增加外泌体相关研究管线。目前国内已有 47 项使用干细胞外泌体开展的临床试验, 其中 10 项已取得显著性成果, 涉及疾病包括干眼症、冠状病毒感染、多器官衰竭、阿尔茨海默病、肺部感染等。

5 结语与展望

不同干细胞分泌的外泌体在许多体内外试验中

均已被证明有免疫调节、抗炎、抗氧化和促进组织修复等特性, 外泌体被靶细胞摄取后有助于调节促进组织修复的信号通路。研究人员在动物模型中已证明, 在缺血再灌注损伤之前、期间以及之后使用外泌体均能减轻组织损伤程度, 并促进损伤组织修复, 表明外泌体具有很大的应用潜力。同时, 外泌体其材质特殊, 具有优秀的生物相容性、表面修饰方便、能够实现远端运输, 以及能够装载多种药物, 因此有望成为新兴的药物递送载体, 为缺血性疾病的治疗提供新思路。并且, 除干细胞来源的外泌体

以外, 非干细胞来源的外泌体也有重要的作用, 如血液来源的外泌体能够实现免疫调控; 乳源外泌体产量大并且能够口服, 可用于治疗肠道疾病。然而, 由于外泌体存在生物利用度低、半衰期短、分离方法复杂等问题, 要实现其临床应用仍需要研究者努力, 需要探索新的外泌体生产分离手段, 以获得同时兼具高浓度与高纯度、批次间稳定、表征分析完备、免疫原性低等特征的优质外泌体样品。此外, 关于外泌体如何促进损伤组织的修复, 以及驱动外泌体产生再生作用的机制也需要进一步研究。

【参考文献】

- [1] Cao Y, Wu T, Zhang K, *et al.* Engineered exosome-mediated near-infrared-II region V(2)C quantum dot delivery for nucleus-target low-temperature photothermal therapy[J]. *ACS Nano*, 2019, 13(2): 1499–1510.
- [2] 王艺璇, 冉桂梅, 严硕丹, 等. 炎症标记物与缺血性中风预后评价[J]. *药学进展*, 2014, 38(12): 897–904.
- [3] Toghiani R, Abolmaali S S, Najafi H, *et al.* Bioengineering exosomes for treatment of organ ischemia-reperfusion injury[J]. *Life Sci*, 2022, 302: 120654. DOI: 10.1016/j.lfs.2022.120654.
- [4] Ali M, Pham A, Wang X, *et al.* Extracellular vesicles for treatment of solid organ ischemia-reperfusion injury[J]. *Am J Transplant*, 2020, 20(12): 3294–3307.
- [5] 孙俊, 姜其慧, 张陆勇, 等. 脑缺血再灌注与神经保护剂联合治疗脑卒中的研究进展[J]. *药学进展*, 2019, 43(8): 593–602.
- [6] Blondeel J, Gilbo N, De Bondt S, *et al.* Stem cell derived extracellular vesicles to alleviate ischemia-reperfusion injury of transplantable organs. A systematic review[J]. *Stem Cell Rev Rep*, 2023, 19(7): 2225–2250.
- [7] Quah B J, O'Neill H C. The immunogenicity of dendritic cell-derived exosomes[J]. *Blood Cells Mol Dis*, 2005, 35(2): 94–110.
- [8] Adamiak M, Cheng G, Bobis-Wozowicz S, *et al.* Induced pluripotent stem cell (iPSC)-derived extracellular vesicles are safer and more effective for cardiac repair than iPSCs[J]. *Circ Res*, 2018, 122(2): 296–309.
- [9] Zheng M, Huang M, Ma X, *et al.* Harnessing exosomes for the development of brain drug delivery systems[J]. *Bioconjug Chem*, 2019, 30(4): 994–1005.
- [10] Yin L, Liu X, Shi Y, *et al.* Therapeutic advances of stem cell-derived extracellular vesicles in regenerative medicine[J]. *Cells*, 2020, 9(3): 707. DOI:10.3390/cells9030707.
- [11] Kim D K, Kang B, Kim O Y, *et al.* EVpedia: an integrated database of high-throughput data for systemic analyses of extracellular vesicles[J]. *J Extracell Vesicles*, 2013, 2: 20384. DOI:10.3402/jev.v2i0.20384.
- [12] Zhang Y, Liu Y, Liu H, *et al.* Exosomes: biogenesis, biologic function and clinical potential[J]. *Cell Biosci*, 2019, 9: 19. DOI:10.1186/s13578-019-0282-2.
- [13] Ge L, Zhang N, Li D, *et al.* Circulating exosomal small RNAs are promising non-invasive diagnostic biomarkers for gastric cancer[J]. *J Cell Mol Med*, 2020, 24(24): 14502–14513.
- [14] Wang X, He L, Huang X, *et al.* Recent progress of exosomes in multiple myeloma: pathogenesis, diagnosis, prognosis and therapeutic strategies[J]. *Cancers (Basel)*, 2021, 13(7): 1635. DOI:10.3390/cancers13071635.
- [15] Zhang Y, Bi J, Huang J, *et al.* Exosome: a review of its classification, isolation techniques, storage, diagnostic and targeted therapy applications[J]. *Int J Nanomedicine*, 2020, 15: 6917–6934.
- [16] McBride J D, Rodriguez-Menocal L, Guzman W, *et al.* Bone marrow mesenchymal stem cell-derived CD63(+) exosomes transport wnt3a exteriorly and enhance dermal fibroblast proliferation, migration, and angiogenesis *in vitro*[J]. *Stem Cells Dev*, 2017, 26(19): 1384–1398.
- [17] Zhang S, Chuah S J, Lai R C, *et al.* MSC exosomes mediate cartilage repair by enhancing proliferation, attenuating apoptosis and modulating immune reactivity[J]. *Biomaterials*, 2018, 156: 16–27.
- [18] Chen C Y, Rao S S, Ren L, *et al.* Exosomal DMBT1 from human

- urine-derived stem cells facilitates diabetic wound repair by promoting angiogenesis[J]. *Theranostics*, 2018, 8(6): 1607–1623.
- [19] Valadi H, Ekström K, Bossios A, *et al.* Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells[J]. *Nat Cell Biol*, 2007, 9(6): 654–659.
- [20] Ratajczak J, Miekus K, Kucia M, *et al.* Embryonic stem cell-derived microvesicles reprogram hematopoietic progenitors: evidence for horizontal transfer of mRNA and protein delivery[J]. *Leukemia*, 2006, 20(5): 847–856.
- [21] Gradilla A C, González E, Seijo I, *et al.* Exosomes as hedgehog carriers in cytoneme-mediated transport and secretion[J]. *Nat Commun*, 2014, 5: 5649. DOI:10.1038/ncomms6649.
- [22] Khan M, Nickoloff E, Abramova T, *et al.* Embryonic stem cell-derived exosomes promote endogenous repair mechanisms and enhance cardiac function following myocardial infarction[J]. *Circ Res*, 2015, 117(1): 52–64.
- [23] Li X, Liu L, Yang J, *et al.* Exosome derived from human umbilical cord mesenchymal stem cell mediates miR-181c attenuating burn-induced excessive inflammation[J]. *EBioMedicine*, 2016, 8: 72–82.
- [24] Mathiyalagan P, Liang Y, Kim D, *et al.* Angiogenic mechanisms of human CD34(+) stem cell exosomes in the repair of ischemic hindlimb[J]. *Circ Res*, 2017, 120(9): 1466–1476.
- [25] Xin H, Wang F, Li Y, *et al.* Secondary release of exosomes from astrocytes contributes to the increase in neural plasticity and improvement of functional recovery after stroke in rats treated with exosomes harvested from microRNA-133b-overexpressing multipotent mesenchymal stromal cells[J]. *Cell Transplant*, 2017, 26(2): 243–257.
- [26] He X, Dong Z, Cao Y, *et al.* MSC-derived exosome promotes M2 polarization and enhances cutaneous wound healing[J]. *Stem Cells Int*, 2019, 2019: 7132708. DOI: 10.1155/2019/7132708.
- [27] Kalogeris T, Baines C P, Krenz M, *et al.* Ischemia/reperfusion[J]. *Compr Physiol*, 2016, 7(1): 113–170.
- [28] Kosieradzki M, Rowiński W. Ischemia/reperfusion injury in kidney transplantation: mechanisms and prevention[J]. *Transplant Proc*, 2008, 40(10): 3279–3288.
- [29] Kurokawa T, Takagi H. Mechanism and prevention of ischemia-reperfusion injury[J]. *Transplant Proc*, 1999, 31(4): 1775–1776.
- [30] Ioannou A, Dalle Lucca J, Tsokos G C. Immunopathogenesis of ischemia/reperfusion-associated tissue damage[J]. *Clin Immunol*, 2011, 141(1): 3–14.
- [31] Thuijs D, Kappetein A P, Serruys P W, *et al.* Percutaneous coronary intervention versus coronary artery bypass grafting in patients with three-vessel or left main coronary artery disease: 10-year follow-up of the multicentre randomised controlled SYNATX trial[J]. *Lancet*, 2019, 394(10206): 1325–1334.
- [32] Head S J, Milojevic M, Daemen J, *et al.* Mortality after coronary artery bypass grafting versus percutaneous coronary intervention with stenting for coronary artery disease: a pooled analysis of individual patient data[J]. *Lancet*, 2018, 391(10124): 939–948.
- [33] Wang N, Chen C, Yang D, *et al.* Mesenchymal stem cells-derived extracellular vesicles, via miR-210, improve infarcted cardiac function by promotion of angiogenesis[J]. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis*, 2017, 1863(8): 2085–2092.
- [34] Li Q, Xu Y, Lv K, *et al.* Small extracellular vesicles containing miR-486-5p promote angiogenesis after myocardial infarction in mice and nonhuman primates[J]. *Sci Transl Med*, 2021, 13(584): eabb0202. DOI:10.1126/scitranslmed.abb0202.
- [35] Zhang Y, Jiao L, Lu L, *et al.* The mechanisms underlying the beneficial effects of stem cell-derived exosomes in repairing ischemic tissue injury[J]. *J Cardiovasc Transl Res*, 2022, 15(3): 524–534.
- [36] Wang W, Zheng Y, Wang M, *et al.* Exosomes derived miR-126 attenuates oxidative stress and apoptosis from ischemia and reperfusion injury by targeting errf1[J]. *Gene*, 2019, 690: 75–80.
- [37] Zhao J, Li X, Hu J, *et al.* Mesenchymal stromal cell-derived exosomes attenuate myocardial ischaemia-reperfusion injury through miR-182-regulated macrophage polarization[J]. *Cardiovasc Res*, 2019, 115(7): 1205–1216.
- [38] Webb R L, Kaiser E E, Jurgielewicz B J, *et al.* Human neural stem cell extracellular vesicles improve recovery in a porcine model of ischemic stroke[J]. *Stroke*, 2018, 49(5): 1248–1256.
- [39] Xin H, Katakowski M, Wang F, *et al.* MicroRNA cluster miR-17-92 cluster in exosomes enhance neuroplasticity and functional recovery after stroke in rats[J]. *Stroke*, 2017, 48(3): 747–753.
- [40] Patel N A, Moss L D, Lee J Y, *et al.* Long noncoding RNA MALAT1 in exosomes drives regenerative function and modulates inflammation-linked networks following traumatic brain injury[J]. *J Neuroinflammation*, 2018, 15(1): 204. DOI:10.1186/s12974-018-

- 1240-3.
- [41] Gregorius J, Wang C, Stambouli O, *et al.* Small extracellular vesicles obtained from hypoxic mesenchymal stromal cells have unique characteristics that promote cerebral angiogenesis, brain remodeling and neurological recovery after focal cerebral ischemia in mice[J]. *Basic Res Cardiol*, 2021, 116(1): 40. DOI:10.1007/s00395-021-00881-9.
- [42] Zhang H, Wu J, Wu J, *et al.* Exosome-mediated targeted delivery of miR-210 for angiogenic therapy after cerebral ischemia in mice[J]. *J Nanobiotechnology*, 2019, 17(1): 29. DOI:10.1186/s12951-019-0461-7.
- [43] Kreisel D, Krupnick A S, Puri V, *et al.* Short- and long-term outcomes of 1000 adult lung transplant recipients at a single center[J]. *J Thorac Cardiovasc Surg*, 2011, 141(1): 215-222.
- [44] Khalaj K, Figueira R L, Antounians L, *et al.* Systematic review of extracellular vesicle-based treatments for lung injury: Are EVs a potential therapy for COVID-19? [J]. *J Extracell Vesicles*, 2020, 9(1): 1795365. DOI:10.1080/20013078.2020.1795365.
- [45] Stone M L, Zhao Y, Robert Smith J, *et al.* Mesenchymal stromal cell-derived extracellular vesicles attenuate lung ischemia-reperfusion injury and enhance reconditioning of donor lungs after circulatory death[J]. *Respir Res*, 2017, 18(1): 212. DOI:10.1186/s12931-017-0704-9.
- [46] Tang X D, Shi L, Monsel A, *et al.* Mesenchymal stem cell microvesicles attenuate acute lung injury in mice partly mediated by Ang-1 mRNA[J]. *Stem Cells*, 2017, 35(7): 1849-1859.
- [47] Cai J, Gehrau R, Tu Z, *et al.* MicroRNA-206 antagomir-enriched extracellular vesicles attenuate lung ischemia-reperfusion injury through CXCL1 regulation in alveolar epithelial cells[J]. *J Heart Lung Transplant*, 2020, 39(12): 1476-1490.
- [48] Ahn S Y, Park W S, Kim Y E, *et al.* Vascular endothelial growth factor mediates the therapeutic efficacy of mesenchymal stem cell-derived extracellular vesicles against neonatal hyperoxic lung injury[J]. *Exp Mol Med*, 2018, 50(4): 1-12.
- [49] Khatri M, Richardson L A, Meulia T. Mesenchymal stem cell-derived extracellular vesicles attenuate influenza virus-induced acute lung injury in a pig model[J]. *Stem Cell Res Ther*, 2018, 9(1): 17. DOI:10.1186/s13287-018-0774-8.
- [50] Potter D R, Miyazawa B Y, Gibb S L, *et al.* Mesenchymal stem cell-derived extracellular vesicles attenuate pulmonary vascular permeability and lung injury induced by hemorrhagic shock and trauma[J]. *J Trauma Acute Care Surg*, 2018, 84(2): 245-256.
- [51] Chaubey S, Thuesen S, Ponnalagu D, *et al.* Early gestational mesenchymal stem cell secretome attenuates experimental bronchopulmonary dysplasia in part via exosome-associated factor TSG-6[J]. *Stem Cell Res Ther*, 2018, 9(1): 173. DOI: 10.1186/s13287-018-0903-4.
- [52] Haga H, Yan I K, Takahashi K, *et al.* Extracellular vesicles from bone marrow-derived mesenchymal stem cells improve survival from lethal hepatic failure in mice[J]. *Stem Cells Transl Med*, 2017, 6(4): 1262-1272.
- [53] Lu T, Zhang J, Cai J, *et al.* Extracellular vesicles derived from mesenchymal stromal cells as nanotherapeutics for liver ischemia-reperfusion injury by transferring mitochondria to modulate the formation of neutrophil extracellular traps[J]. *Biomaterials*, 2022, 284: 121486. DOI:10.1016/j.biomaterials.2022.121486.
- [54] Tamura R, Uemoto S, Tabata Y. Immunosuppressive effect of mesenchymal stem cell-derived exosomes on a concanavalin a-induced liver injury model[J]. *Inflamm Regen*, 2016, 36: 26. DOI:10.1186/s41232-016-0030-5.
- [55] Rigo F, De Stefano N, Navarro-Tableros V, *et al.* Extracellular vesicles from human liver stem cells reduce injury in an *ex vivo* normothermic hypoxic rat liver perfusion model[J]. *Transplantation*, 2018, 102(5): e205-e210. DOI:10.1097/TP.0000000000002123.
- [56] Zheng J, Lu T, Zhou C, *et al.* Extracellular vesicles derived from human umbilical cord mesenchymal stem cells protect liver ischemia/reperfusion injury by reducing CD154 expression on CD4⁺ T cells via CCT2[J]. *Adv Sci (Weinh)*, 2020, 7(18): 1903746. DOI:10.1002/advs.201903746.
- [57] Lien Y H, Lai L W, Silva A L. Pathogenesis of renal ischemia/reperfusion injury: lessons from knockout mice[J]. *Life Sci*, 2003, 74(5): 543-552.
- [58] Tomasoni S, Longaretti L, Rota C, *et al.* Transfer of growth factor receptor mRNA via exosomes unravels the regenerative effect of mesenchymal stem cells[J]. *Stem Cells Dev*, 2013, 22(5): 772-780.
- [59] Eirin A, Zhu X Y, Puranik A S, *et al.* Mesenchymal stem cell-derived extracellular vesicles attenuate kidney inflammation[J]. *Kidney Int*, 2017, 92(1): 114-124.

- [60] Wang B, Yao K, Huuskens B M, *et al.* Mesenchymal stem cells deliver exogenous microRNA-let7c via exosomes to attenuate renal fibrosis[J]. *Mol Ther*, 2016, 24(7): 1290–1301.
- [61] Zhang Y, Wang J, Yang B, *et al.* Transfer of microRNA-216a-5p from exosomes secreted by human urine-derived stem cells reduces renal ischemia/reperfusion injury[J]. *Front Cell Dev Biol*, 2020, 8: 610587. DOI:10.3389/fcell.2020.610587.
- [62] Yuan X, Li D, Chen X, *et al.* Extracellular vesicles from human-induced pluripotent stem cell-derived mesenchymal stromal cells (hiPSC-MSCs) protect against renal ischemia/reperfusion injury via delivering specificity protein (SP1) and transcriptional activating of sphingosine kinase 1 and inhibiting necroptosis[J]. *Cell Death Dis*, 2017, 8(12): 3200. DOI:10.1038/s41419-017-0041-4.
- [63] Kou M, Huang L, Yang J, *et al.* Mesenchymal stem cell-derived extracellular vesicles for immunomodulation and regeneration: a next generation therapeutic tool?[J]. *Cell Death Dis*, 2022, 13(7): 580. DOI:10.1038/s41419-022-05034-x.
- [64] Chen T S, Arslan F, Yin Y, *et al.* Enabling a robust scalable manufacturing process for therapeutic exosomes through oncogenic immortalization of human ESC-derived MSCs[J]. *J Transl Med*, 2011, 9: 47. DOI:10.1186/1479-5876-9-47.
- [65] Cha J M, Shin E K, Sung J H, *et al.* Efficient scalable production of therapeutic microvesicles derived from human mesenchymal stem cells[J]. *Sci Rep*, 2018, 8(1): 1171. DOI:10.1038/s41598-018-19211-6.
- [66] Patel D B, Santoro M, Born L J, *et al.* Towards rationally designed biomanufacturing of therapeutic extracellular vesicles: impact of the bioproduction microenvironment[J]. *Biotechnol Adv*, 2018, 36(8): 2051–2059.
- [67] Nooshabadi V T, Mardpour S, Yousefi-Ahmadipour A, *et al.* The extracellular vesicles-derived from mesenchymal stromal cells: a new therapeutic option in regenerative medicine[J]. *J Cell Biochem*, 2018, 119(10): 8048–8073.
- [68] Soares Martins T, Catita J, Martins Rosa I, *et al.* Exosome isolation from distinct biofluids using precipitation and column-based approaches[J]. *PLoS One*, 2018, 13(6): e0198820. DOI:10.1371/journal.pone.0198820.
- [69] Kimmelman J, Heslop H E, Sugarman J, *et al.* NewISSCR guidelines: clinical translation of stem cell research[J]. *Lancet*, 2016, 387(10032): 1979–1981.



【专家介绍】 田田：博士，南京医科大学基础医学院副教授，江苏省自然科学基金优秀青年基金获得者，美国哈佛医学院 / 麻省总医院访问学者，江苏省首席科技传播专家，江苏省免疫学会神经免疫分会委员。在外泌体领域获得多个国家自然科学基金和江苏省自然科学基金以及国家重点研发计划的资助。研究成果获河南省科技成果一等奖、河南医学科技一等奖、河南省自然科学二等奖、江苏省“科创江苏”创新创业大赛三等奖。在 *ACS Nano*、*Biomaterials*、*Cancer Res* 等期刊上发表多篇论文。论文被引总计 4 000 余次，ESI 高引用论文 5 篇。