

## 不同干细胞来源的外泌体在缺血性心脏病中的促血管新生作用

肖轶 余国龙

(中南大学湘雅医院, 湖南 长沙 410008)

**【摘要】** 缺血性心脏病是指各种原因造成心肌供血量不足, 导致氧气和营养物质供应不足, 引起各种心脏功能障碍。促血管新生是治疗缺血性心脏病的一个关键因素。越来越多的研究表明, 干细胞来源的外泌体作为一种细胞间相互作用的媒介, 为缺血性心脏病的治疗提供了新的可能。现对各种干细胞来源的外泌体在治疗缺血性心脏病中促血管新生作用及机制做一综述。

**【关键词】** 外泌体; 缺血性心脏病; 血管新生; 干细胞

**【DOI】** 10.16806/j.cnki.issn.1004-3934.2022.04.002

## Application of Exosomes Derived from Various Stem Cells in Ischemic Heart Disease

XIAO Yi, YU Guolong

(Xiangya Hospital of Central South University, Changsha 410008, Hunan, China)

**【Abstract】** Ischemic heart disease refers to the lack of myocardial blood supply caused by various factors, resulting in the lack of oxygen and nutrients supply and cardiac dysfunction. Promoting angiogenesis is a key factor in the treatment of ischemic heart disease. More and more studies have shown that stem cell-derived exosomes, as a messenger of cellular interaction, provide a new strategy for the treatment of ischemic heart disease. This paper aims to review the therapeutic effect of exosomes from various stem cells in ischemic heart disease and its mechanism.

**【Key words】** Exosomes; Ischemic heart disease; Angiogenesis; Stem cells

血管新生是指从血管床形成新的毛细血管的过程, 是治疗缺血性疾病的关键<sup>[1]</sup>。目前缺血性疾病的治疗主要包括溶栓药物和手术, 但这些方法不能重塑缺血区血管床和诱导血管新生。近年来, 研究者们利用干细胞来诱导缺血性疾病的血管新生<sup>[2-3]</sup>。干细胞可通过分化成细胞和/或释放旁分泌因子来参与修复缺血区。然而, 干细胞治疗仍有限制性, 如伦理问题、技术问题、免疫原性和致癌性等<sup>[4]</sup>。越来越多的研究表明, 来自干细胞的细胞外囊泡 (extracellular vesicles, EVs) 能促进缺血性疾病的治疗。其中, 外泌体也属于 EVs, 通过转运各种血管生成因子到缺血组织来促进血管新生。血管新生可能通过两种机制发生, 包括萌芽性血管新生和套入式血管新生。缺氧是诱发萌芽性血管新生的主要因素, 而血流动力学改变则可诱发套入式血管新生。萌芽性血管新生是常见的血管新生方式, 主要有两种细胞参与, 包括内皮细胞和血管壁细胞 (如平滑肌细胞或周细胞)<sup>[5-6]</sup> (图 1)。在血管

新生过程中, 基质金属蛋白酶首先降解细胞外基质, 细胞外基质和血管内皮生长因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF) 激活内皮细胞, 这个过程通常被称为 VEGF 的刺激。在尖端细胞形成过程中, 内皮细胞可能变成独特的形态, 并伴有向细胞外基质发展的趋势。柄细胞是尖端细胞后的一种细胞, 支持新生管的增殖和伸长。不同的刺激因子和信号分子可促进内皮细胞的增殖和迁移, 从而使细胞形成发芽的小管。尖端细胞有助于新形成的管状物的伸长和引导。在管状物形成的过程中, 新形成的小管相互融合, 壁细胞如周细胞可促进新生毛细血管的稳定<sup>[5-8]</sup>。血管新生是否发生取决于促进和抑制血管生成的因素之间的平衡关系。增加促血管生成因子 (如血管生成素、成纤维细胞生长因子、VEGF、转化生长因子- $\alpha$  和表皮生长因子) 可诱导血管新生, 但增加抗血管生成因子 (如血管抑素、血栓软骨素-1/2、干扰素、内酯和胶原 IV) 可抑制血管生成<sup>[5-8]</sup>。

基金项目: 湖南省自然科学基金 (2020JJ4921)

通信作者: 余国龙, E-mail: yugulong123@aliyun.com

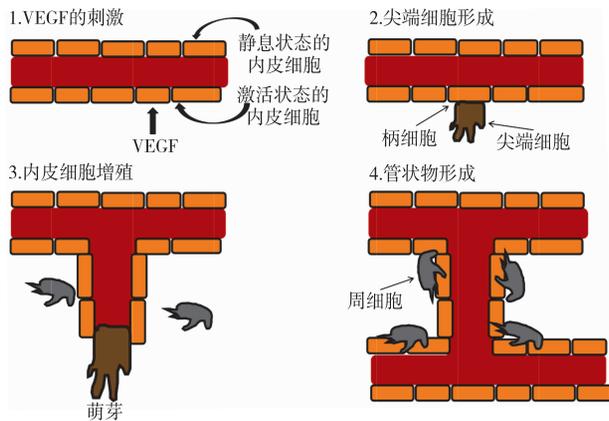
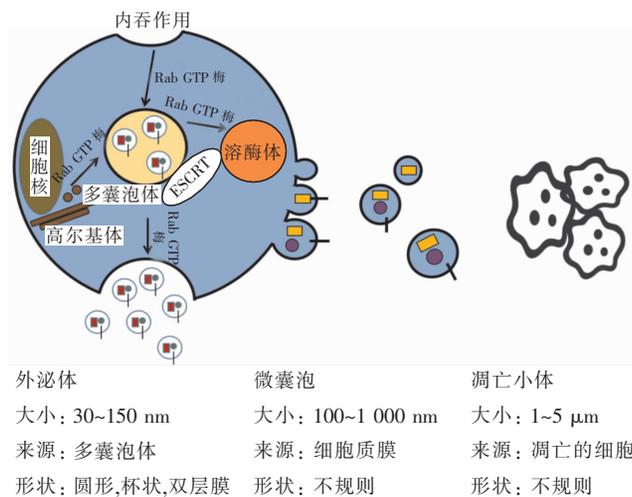


图 1 萌芽性血管新生示意图

外泌体直径大小 30 ~ 150 nm, 在电镜下呈双层膜的茶杯状<sup>[9]</sup>。国际细胞外囊泡协会提出了“细胞外囊泡”这个术语, 指的是从生物液和细胞条件培养基中分离出来的囊泡。EVs 包括外泌体、微囊泡和凋亡小体(图 2)。这些囊泡内含有多种生物分子, 它们在细胞之间转移从而发挥生物学效应<sup>[10]</sup>。许多细胞包括正常细胞、肿瘤细胞和干细胞都可产生外泌体<sup>[11]</sup>(图 2)。外泌体是当不同的分子或复合物作用于多囊泡体上的内体分拣转运复合物, 多囊泡体与质膜融合后产生的一类 EVs。若在细胞内与溶酶体融合, 则发生降解, 与质膜融合后, 以微囊泡形式排出细胞外。Rab GTP 酶参与调节多囊泡体的细胞内运输。外泌体的内容物是由不同类型的分子组成, 可能来源于高尔基体、细胞质或内体途径<sup>[11]</sup>。外泌体膜上有典型的标记物, 如 TSG101、Alix、整联蛋白和四肽类(如 CD63、CD9 和 CD81)<sup>[11]</sup>。研究<sup>[12]</sup>表明, 相比于干细胞, 外泌体不仅能发挥治疗作用, 还能避免许多风险。在此, 归纳总结来自不同干细胞的外泌体在缺血性心脏病中的促血管新生作用及机制。



注: ESCRT 为内体分拣转运复合物。

图 2 EVs 的生物生成及其特点

## 1 不同干细胞来源的外泌体在缺血性心脏病中的血管新生作用

缺血性心脏病, 是指各种因素引起的心脏氧供不足, 心肌组织坏死和心功能异常。最常见的原因是冠状动脉的严重阻塞, 临床治疗主要包括介入支架或外科搭桥。然而, 这种方法适用于动脉直径 > 2 mm 的患者, 因此, 动脉直径 < 2 mm 的患者, 以及有手术史、动静脉移植不足和冠状动脉病变等病史的患者仍需关注其他促血管新生的方法<sup>[13]</sup>。最新研究进展表明, 干细胞来源的外泌体能促进缺血区血管新生, 可能是一种治疗心肌缺血更有前途的方法(表 1)。

表 1 改善缺血性心脏病血管新生的干细胞来源的外泌体内容物

| 外泌体来源                | 外泌体内容物                             |
|----------------------|------------------------------------|
| CDCs                 | miR-120、miR-130a、miR-126、miR-146a  |
| CPCs                 | miR-210、miR-322                    |
| EPCs                 | OCN                                |
| CD34 <sup>+</sup> 细胞 | Shh 蛋白                             |
| ESCs                 | 未知                                 |
| iPSCs                | 未知                                 |
| MSCs                 | CXCR4、miR-21、miR-30b、EMMPRIN、HMGB1 |

注: CDCs 为心脏肌球衍生细胞; CPCs 为心肌祖细胞; EPCs 为内皮祖细胞; OCN 为骨钙素; Shh 蛋白为 Sonic Hedgehog 蛋白; ESCs 为胚胎干细胞; iPSCs 为诱导多能干细胞; MSCs 为间充质干细胞; CXCR4 为趋化因子受体 4; EMMPRIN 为细胞外基质金属蛋白酶诱导因子; HMGB1 为高迁移率族蛋白 B1。

### 1.1 心脏肌球衍生细胞来源的外泌体

心脏肌球衍生细胞(cardiosphere-derived cells, CDCs)被认为是心脏祖细胞, 能形成各种心脏细胞, 包括内皮细胞、心肌细胞和平滑肌细胞<sup>[14]</sup>。研究表明, CDCs 可诱导血管新生, 改善心肌梗死动物模型的心功能<sup>[15]</sup>。后续发现, CDCs 来源的外泌体(CDCs-Exo)也有相同的作用<sup>[16]</sup>。Gallet 等<sup>[17]</sup>发现, 在急性心肌梗死(acute myocardial infarction, AMI)猪模型中, 心肌内注射 CDCs-Exo 可诱导缺血区血管新生, 从而促进心肌修复。含有 miR-146a 的 CDCs-Exo 可减少心肌细胞的凋亡并增加心肌细胞的增殖。将这些外泌体注射到小鼠 AMI 模型的心脏组织中, 显著促进了血管新生和心肌修复。Namazi 等<sup>[18]</sup>发现, 缺氧状态下的 CDCs 可释放出内含不同 miRNAs 的外泌体, 这些外泌体含有高水平的 miR-210、miR-130a 和 miR-126, 能诱导人脐静脉内皮细胞(human umbilical vein endothelial cells, HUVECs)的血管新生。

### 1.2 心肌祖细胞和内皮祖细胞来源的外泌体

心肌祖细胞(cardiac progenitor cells, CPCs)和内皮祖细胞(endothelial progenitor cells, EPCs)可分别形成心肌细胞和内皮细胞。研究表明, 缺氧微环境下的

CPCs 及其外泌体 (CPCs-Exo) 可促进血管新生和心肌修复<sup>[19]</sup>。CPCs-Exo 内含丰富的 miR-210, 具有抑制心肌细胞凋亡、促进血管生成和改善心功能等保护作用<sup>[20]</sup>。过表达 miR-322 的 CPCs-Exo 可促进人内皮细胞的血管新生, 其机制是通过增加活性氧来促进内皮细胞的迁移和毛细血管形成<sup>[21]</sup>。另外, 研究<sup>[22]</sup>表明过表达骨钙素 (osteocalcin, OCN) 的 EPCs 来源的外泌体可通过激活 OCN-GPRC6A 通路来促进内皮细胞血管新生。

### 1.3 胚胎干细胞来源的外泌体

Khan 等<sup>[23]</sup>将胚胎干细胞 (embryonic stem cells, ESCs) 来源的外泌体注射到小鼠 AMI 模型的心肌组织内, 结果表明心肌中新生血管密度明显增加。来自人 ESCs 衍生的 CPCs-Exo 移植到小鼠 AMI 模型有心脏保护作用。进一步研究<sup>[24]</sup>表明, 外泌体移植的心肌中有 927 个基因上调, 其中大部分与心脏功能有关。同样, 在小鼠缺血再灌注损伤模型中, 从人 ESCs 衍生的间充质干细胞 (mesenchymal stem cells, MSCs) 来源的外泌体通过促进磷酸化丝氨酸/苏氨酸激酶 (p-Akt) 和磷酸化糖原合酶激酶 3 $\beta$  (p-GSK-3 $\beta$ ) 的表达可减少梗死面积, 促进血管新生和心肌修复<sup>[25]</sup>。

### 1.4 CD34<sup>+</sup> 细胞来源的外泌体

研究<sup>[26]</sup>表明, CD34<sup>+</sup> 细胞来源的外泌体 (CD34<sup>+</sup>-Exo) 可促进内皮细胞的存活和增殖, 有利于血管新生。Mackie 等<sup>[27]</sup>发现, CD34<sup>+</sup>-Exo 内含高水平的 Sonic Hedgehog (Shh) 蛋白, 可改善心肌梗死缺血区血管新生和心功能。

### 1.5 MSCs 来源的外泌体

MSCs 来源的外泌体 (MSCs-Exo) 可被内皮细胞摄取, 从而促进血管新生。Teng 等<sup>[28]</sup>发现在心肌梗死动物模型中注射 MSCs-Exo 可增加新生血管密度。研究<sup>[29]</sup>表明, 过表达 CXCR4 的 MSCs-Exo 可激活心肌细胞内 Akt 信号通路, 从而抑制心肌细胞的凋亡, 并增加 VEGF 的表达和血管新生。在大鼠心肌梗死模型中, 这些外泌体通过诱导血管新生、减少梗死面积和增加心脏功能来促进心肌梗死后的恢复<sup>[29]</sup>。Vrijisen 等<sup>[30]</sup>通过体外和体内试验表明, 骨髓 MSCs-Exo 可通过激活 ERK/Akt 信号通路来促进内皮细胞的迁移和新生血管的形成。另有研究<sup>[31]</sup>表明, 脐带 MSCs-Exo 能上调内皮细胞内 Bcl-2 家族蛋白的表达, 从而增加内皮细胞的迁移和新生血管的形成。Wang 等<sup>[32]</sup>研究认为, 在大鼠 AMI 模型上, 与骨髓和脂肪来源的 MSCs-Exo 相比, 子宫内膜来源的 MSCs-Exo 能更有效地增加新生微血管密度。这些外泌体中含有丰富的 miR-21, 可通过激活 PTEN/Akt 通路发挥心脏保护作用。另

外, 研究<sup>[33]</sup>发现 MSCs-Exo 可转运 miR-30b 到 HUVECs, 靶向调节 DLL4, 从而发挥血管新生作用。最新研究<sup>[34]</sup>发现, 在缺氧条件下, 骨髓 MSCs-Exo 可通过转移高迁移率族蛋白 B1 到 HUVECs, 通过 JNK/HIF-1 $\alpha$  途径促进血管新生。

### 1.6 诱导多能干细胞来源的外泌体

诱导多能干细胞 (induced pluripotent stem cells, iPSCs) 在组织再生领域具有重要作用。iPSCs 是通过将体细胞重新编码为类似胚胎的多能状态而产生的, 具有不同的分化特征。iPSCs 及其外泌体 (iPSCs-Exo) 通过诱导内皮细胞迁移和血管新生, 在心力衰竭的治疗中具有积极的作用。例如, 当 iPSC-Exo 被注入心肌梗死小鼠的心脏时, 其增加了梗死区和边界区毛细血管的再生<sup>[35]</sup>。iPSCs 衍生的 CPCs-Exo 能促进 HUVECs 迁移和血管新生。此外, 这些外泌体的治疗能显著提高左室射血分数和减少左室容积, 有助于恢复心功能<sup>[36]</sup>。

## 2 优势和限制

外泌体在缺血性心脏病的应用中具备很多优势。研究者们<sup>[37]</sup>可通过不同的方式, 如细胞工程或预处理母体细胞, 改变外泌体内容物, 将特定的生物分子传递到靶细胞。另一个优势是外泌体本身的生物特质, 可使其成为生物成分和药物的天然纳米载体。因此, 外泌体未来有望应用于个性化医疗。此外, 外泌体的移植, 尤其是 MSCs-Exo, 是相对安全和非肿瘤源性的, 甚至异体来源也不会产生免疫排斥。尽管如此, 目前在外泌体的定义、分离和应用方面仍有一些限制。一些研究可能未使用国际细胞外囊泡协会更新的外泌体指南。EVs 的大小甚至标记都可能重叠, 这可能会影响结果, 所以研究者可能会无意中使用了外泌体这个术语。另外, 当研究者使用不同的方法来分离外泌体也会影响到实验的结果。此外, 不同的外泌体给药方式对于治疗效果至关重要。尽管研究者已研究了不同的给药方法来将外泌体送入靶组织, 但究竟哪一种给药方式获益更多仍需更多的研究数据来支持<sup>[4]</sup>。

## 3 总结

大量研究表明干细胞来源的外泌体具有促血管新生的潜力, 可参与治疗缺血性心脏病, 但这些研究大多是在临床前进行的, 临床研究仍有待继续推进。外泌体治疗虽然有优势, 但也有一些局限, 未来需更多研究来解决, 包括分离方式、给药方法及保存条件等, 最终使得外泌体治疗能应用于临床。

## 参考文献

[1] Grifoen AW, Molema G. Angiogenesis: potentials for pharmacologic intervention

- in the treatment of cancer, cardiovascular diseases, and chronic inflammation[J]. *Pharmacol Rev*, 2000, 52(2):237-268.
- [2] Khaksar M, Sayyari M, Rezaie J, et al. High glucose condition limited the angiogenic/cardiogenic capacity of murine cardiac progenitor cells in in vitro and in vivo milieu[J]. *Cell Biochem Funct*, 2018, 36(7):346-356.
- [3] Abdyazdani N, Nourazarian A, Charoudeh HN, et al. The role of morphine on rat neural stem cells viability, neuro-angiogenesis and neuro-steroidogenesis properties[J]. *Neurosci Lett*, 2017, 636:205-212.
- [4] Akbari A, Jabbari N, Sharif R, et al. Free and hydrogel encapsulated exosome-based therapies in regenerative medicine[J]. *Life Sci*, 2020, 249:117447.
- [5] Adams RH, Alitalo K. Molecular regulation of angiogenesis and lymphangiogenesis[J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2007, 8(6):464-478.
- [6] Ahmadi M, Rezaie J. Tumor cells derived-exosomes as angiogenic agents: possible therapeutic implications[J]. *J Transl Med*, 2020, 18(1):294.
- [7] Eichhorn ME, Kleespies A, Angele MK, et al. Angiogenesis in cancer: molecular mechanisms, clinical impact [J]. *Langenbecks Arch Surg*, 2007, 392(3):371-379.
- [8] Ladomery MR, Harper SJ, Bates DO. Alternative splicing in angiogenesis: the vascular endothelial growth factor paradigm [J]. *Cancer Lett*, 2007, 249(2):133-142.
- [9] Tschuschke M, Kocherova I, Bryja A, et al. Inclusion biogenesis, methods of isolation and clinical application of human cellular exosomes[J]. *J Clin Med*, 2020, 9(2):436.
- [10] Akbari A, Rezaie J. Potential therapeutic application of mesenchymal stem cell-derived exosomes in SARS-CoV-2 pneumonia[J]. *Stem Cell Res Ther*, 2020, 11(1):356.
- [11] Urbanelli L, Magini A, Buratta S, et al. Signaling pathways in exosomes biogenesis, secretion and fate[J]. *Genes(Basel)*, 2013, 4(2):152-170.
- [12] Zhang J, Chen C, Hu B, et al. Exosomes derived from human endothelial progenitor cells accelerate cutaneous wound healing by promoting angiogenesis through Erk1/2 signaling[J]. *Int J Biol Sci*, 2016, 12(12):1472-1487.
- [13] Ertl G, Frantz S. Healing after myocardial infarction[J]. *Cardiovasc Res*, 2005, 66(1):22-32.
- [14] Marbún E. Breakthroughs in cell therapy for heart disease: focus on cardiosphere-derived cells[J]. *Mayo Clin Proc*, 2014, 89(6):850-858.
- [15] Kreke M, Smith RR, Marbún L, et al. Cardiospheres and cardiosphere-derived cells as therapeutic agents following myocardial infarction [J]. *Expert Rev Cardiovasc Ther*, 2012, 10(9):1185-1194.
- [16] Ibrahim AG, Cheng K, Marbún E. Exosomes as critical agents of cardiac regeneration triggered by cell therapy [J]. *Stem Cell Reports*, 2014, 2(5):606-619.
- [17] Gallet R, Dawkins J, Valle J, et al. Exosomes secreted by cardiosphere-derived cells reduce scarring, attenuate adverse remodeling, and improve function in acute and chronic porcine myocardial infarction[J]. *Eur Heart J*, 2017, 38(3):201-211.
- [18] Namazi H, Mohit E, Namazi I, et al. Exosomes secreted by hypoxic cardiosphere-derived cells enhance tube formation and increase pro-angiogenic miRNA[J]. *J Cell Biochem*, 2018, 119(5):4150-4160.
- [19] Dougherty JA, Patel N, Kumar N, et al. Human cardiac progenitor cells enhance exosome release and promote angiogenesis under physoxia [J]. *Front Cell Dev Biol*, 2020, 8:130.
- [20] Wang L, Jia Q, Xinnong C, et al. Role of cardiac progenitor cell-derived exosome-mediated microRNA-210 in cardiovascular disease [J]. *J Cell Mol Med*, 2019, 23(11):7124-7131.
- [21] Youn SW, Li Y, Kim YM, et al. Modification of cardiac progenitor cell-derived exosomes by miR-322 provides protection against myocardial infarction through Nox2-dependent angiogenesis[J]. *Antioxidants(Basel)*, 2019, 8(1):18.
- [22] Yi M, Wu Y, Long J, et al. Exosomes secreted from osteocalcin-overexpressing endothelial progenitor cells promote endothelial cell angiogenesis [J]. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2019, 317(5):932-941.
- [23] Khan M, Nickolof 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.
- [24] Kervadec A, Bellamy V, El Harane N, et al. Cardiovascular progenitor-derived extracellular vesicles recapitulate the beneficial effects of their parent cells in the treatment of chronic heart failure[J]. *J Heart Lung Transplant*, 2016, 35(6):795-807.
- [25] Arslan F, Lai RC, Smeets MB, et al. Mesenchymal stem cell derived exosomes increase ATP levels, decrease oxidative stress and activate PI3K/Akt pathway to enhance myocardial viability and prevent adverse remodeling after myocardial ischemia/reperfusion injury[J]. *Stem Cell Res*, 2013, 10(3):301-312.
- [26] Burke J, Kolhe R, Hunter M, et al. Stem cell-derived exosomes: a potential alternative therapeutic agent in orthopaedics [J]. *Stem Cells Int*, 2016, 2016:5802529.
- [27] Mackie AR, Klyachko E, Thorne T, et al. Sonic hedgehog-modified human CD34+ cells preserve cardiac function after acute myocardial infarction [J]. *Circ Res*, 2012, 111(3):312-321.
- [28] Teng X, Chen L, Chen W, et al. Mesenchymal stem cell-derived exosomes improve the microenvironment of infarcted myocardium contributing to angiogenesis and anti-inflammation [J]. *Cell Physiol Biochem*, 2015, 37(6):2415-2424.
- [29] Kang K, Ma R, Cai W, et al. Exosomes secreted from CXCR4 overexpressing mesenchymal stem cells promote cardioprotection via Akt signaling pathway following myocardial infarction[J]. *Stem Cells Int*, 2015, 2015:659890.
- [30] Vrijisen KR, Maring JA, Chamuleau SA, et al. Exosomes from cardiomyocyte progenitor cells and mesenchymal stem cells stimulate angiogenesis via EMMPRIN[J]. *Adv Healthc Mater*, 2016, 5(19):2555-2565.
- [31] Zhao Y, Sun X, Cao W, et al. Exosomes derived from human umbilical cord mesenchymal stem cells relieve acute myocardial ischemic injury[J]. *Stem Cells Int*, 2015, 2015:761643.
- [32] Wang K, Jiang Z, Webster KA, et al. Enhanced cardioprotection by human endometrium mesenchymal stem cells driven by exosomal microRNA-21 [J]. *Stem Cells Transl Med*, 2017, 6(1):209-222.
- [33] Min G, Bin Y, Jingcai W, et al. Mesenchymal stem cells release exosomes that transfer miRNAs to endothelial cells and promote angiogenesis[J]. *Oncotarget*, 2017, 8(28):45200-45212.
- [34] Gao W, He R, Ren J, et al. Exosomal HMGB1 derived from hypoxia-conditioned bone marrow mesenchymal stem cells increases angiogenesis via the JNK/HIF-1 alpha pathway[J]. *FEBS Open Bio*, 2021, 11(5):1364-1373.
- [35] 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.
- [36] El Harane N, Kervadec A, Bellamy V, et al. Acellular therapeutic approach for heart failure: in vitro production of extracellular vesicles from human cardiovascular progenitors[J]. *Eur Heart J*, 2018, 39(20):1835-1847.
- [37] Arenaccio C, Chiozzini C, Ferrantelli F, et al. Exosomes in therapy: engineering, pharmacokinetics and future applications[J]. *Curr Drug Targets*, 2019, 20(1):87-95.

收稿日期:2021-11-28