

间充质干细胞外泌体抗肝纤维化的机制及其优化策略*

周晓磊^{1,2} 徐岩^{1,2} 金煜¹ 叶俊松^{2,3,4,5**}

(1 赣南医科大学 赣州 341000 2 赣南医科大学第一附属医院干细胞临床转化分中心 赣州 341000)

(3 赣州市干细胞与再生医学重点实验室 赣州 341000)

(4 赣南医科大学江西省医用组织工程材料与生物制造重点实验室 赣州 341000)

(5 赣南医科大学心脑血管疾病防治教育部重点实验室 赣州 341000)

摘要 肝纤维化是肝脏疾病治疗领域的一大难题。间充质干细胞可用于治疗肝纤维化,但因其可能的致癌性、促癌性及移植所需细胞量大等问题受到限制。近年来,间充质干细胞外泌体以更小的体积、更低的免疫原性、无致癌性等优势逐渐成为研究热点。然而,间充质干细胞外泌体在临床应用上也受到限制:首先,目前对不同种类间充质干细胞外泌体的提取与鉴定缺乏更为标准统一的方式;其次,间充质干细胞外泌体治疗肝纤维化的机制尚不清晰;最后,间充质干细胞外泌体治疗存在靶向活化的肝星状细胞(aHSC)能力弱、外泌体产量低、载药能力和递送效率低等问题。鉴于以上原因,对引起常见间充质干细胞外泌体提取效果差异的因素、间充质干细胞外泌体改善肝纤维化的机制及其优化策略进行综述,为间充质干细胞外泌体治疗肝纤维化提供新理解、新思路。

关键词 间充质干细胞外泌体 肝纤维化 机制 优化策略

中图分类号 Q2

肝纤维化是肝脏疾病治疗领域的一大难题,肝星状细胞(hepatic stellate cell,HSC)活化是肝纤维化发生的标志。HSC 活跃于肝细胞与肝窦内皮细胞(liver sinusoidal endothelial cells,LSECs)之间,静态下有储存维生素和调节肝窦血流的能力^[1]。当肝脏损伤时,一方面邻近细胞以旁分泌方式释放炎性因子活化 HSC,另一方面炎性环境也可刺激肝巨噬细胞分泌 IL-1 β 和 IL-6 使 HSC 进一步活化。紧接着,活化的 HSC(activated hepatic stellate cell,aHSC)既能通过分泌转化生长因子 β (transforming growth factor β ,TGF- β)维持自身活化状态,又能转化为肌成纤维细胞分泌I型胶原蛋白(type I collagen,COL-I)、III型胶原蛋白(type III collagen,COL-III)和 α -平滑肌肌动蛋白(α -smooth muscle actin, α -SMA)

收稿日期:2023-12-28 修回日期:2024-02-22

* 国家自然科学基金(32060232)、江西省自然科学基金(20212BAB206075)资助项目

**通讯作者,电子信箱:yjs1211@163.com

等^[2]。并且,aHSC 也可使基质金属蛋白酶组织抑制剂(tissue inhibitor of metalloproteinase;TIMP)分泌增加促使胶原沉积。最终在 HSC 增殖、迁移与细胞外基质不断积累下发展成肝纤维化,见图 1。

间充质干细胞(mesenchymal stem cells,MSCs)是一类具有增殖分化潜能的多能干细胞,其广泛分布于骨髓、脂肪与脐带等组织。大量研究表明,MSCs 可迁移至肝脏损伤部位,通过各种方式改善肝纤维化。其治疗机制^[3]包括:(1)分泌肝细胞生长因子(hepatocyte growth factor,HGF)与肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor- α ,TNF- α)刺激肝细胞增殖并增强其功能;(2)MSCs 通过细胞间接接触或分泌因子以抑制免疫细胞的增殖;(3)MSCs 通过抑制 aHSC 增殖及促凋亡来改善肝功能;(4)MSCs 可定向分化为肝样细胞替代凋亡的肝细胞。虽然 MSCs 在肝脏疾病方面展现出较好疗效,但因可能的致癌性、促癌性和移植的细胞量大等问题严重阻碍了 MSCs 的临床应用。

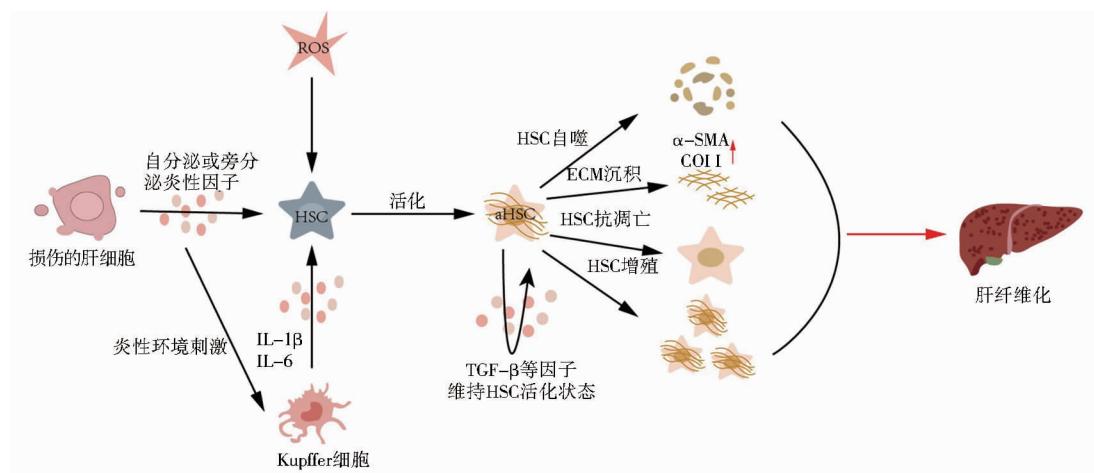


图1 肝纤维化发生的分子机制

Fig. 1 The molecular mechanism of liver fibrosis occurrence

间充质干细胞外泌体 (mesenchymal stem cell exosomes, MSC-exos) 治疗或许能解决上述问题。在肝纤维化治疗方面,与 MSCs 相比, MSC-exos 的治疗优势主要有三点:首先,除了具有与亲本 MSCs 相似的生物学功能外,其以更小体积、更低免疫原性及易于获取等优势被广泛应用^[4];其次,由于体内没有活细胞存在,可进一步降低肿瘤形成的风险;最后, MSC-exos 除了直接干预肝纤维化外,也可作为药物载体协同治疗肝纤维化。尽管 MSC-exos 已具备如此多的优势,但目前对 MSC-exos 治疗肝纤维化的机制仍不清晰,值得进一步探究。此外, MSC-exos 治疗肝纤维化也存在缺陷,如存在靶向 aHSC 能力弱、外泌体产量低、载药能力和递送效率低等问题^[5-9]也亟须解决。因此,作者以 MSC-exos 治疗肝纤维化为主题,对引起 MSC-exos 提取效果差异的因素、抗肝纤维化机制及 MSC-exos 治疗肝纤维化的优化策略进行综述。

1 MSC-exos 的提取与鉴定

1.1 引起 MSC-exos 提取效果差异的因素

1.1.1 提取方法 由于传统分离方法在提取 MSC-exos 时存在操作烦琐、效率低以及外泌体产量与纯度较低等局限,近年来出现了许多新分离方法,包括超滤分离技术、集成双过滤微流控装置、纳米等离子体增强散射、膜介导的外泌体分离和外泌体的芯片上分离等^[10]。虽然在新技术改进下外泌体产量与纯度有一定提升,但仍存在成本高、设备要求高等缺点。近年来有研究表明,在使用差速超速离心提取脂肪间充质干

胞外泌体 (adipose-derived mesenchymal stem cell exosomes, AD-MSC-exos) 时,从 Western blot 与流式细胞仪等检测中发现,与行 2 h 和 3 h 差速超速离心相比,行 1 h 组的 AD-MSC-exos 纯度最高,耗时最短^[11]。由此可见,除了提取方法外,离心时间不同对外泌体的提取也有影响。当然,除了上述单独提取法外,联合提取法也逐渐展现其价值。有研究者发现,对相同来源的样本行外泌体分离,联合提取法在外泌体纯度与产量的总体效率上优于单独提取法。而且,对不同样品材料,通过搭配不同提取方式可使分离得到的外泌体纯度和产量达到最佳平衡^[12]。目前,还没有一种外泌体分离方法适合所有外泌体研究,或许可以针对样品材料种类的不同,采用相应的单独或联合提取法以满足不同实验要求。外泌体不同提取方法的优缺点见表 1。

1.1.2 引起 MSC-exos 提取效果差异的其他因素 除了提取方法与离心时间的差异外, MSCs 培养方式及 MSC-exos 来源不同也能影响 MSC-exos 提取。

(1) MSCs 培养方式与所处环境 有研究发现,在传统超速离心技术下,经 3D 培养的 MSCs 产生的 MSC-exos 量是 2D 培养的 20 倍,表明 MSCs 在 3D 培养模式下能分离更多 MSC-exos,这为 MSC-exos 的基础研究与临床应用扫清了一个重要障碍^[22-23]。还有研究发现,长期低氧培养 MSCs 并不影响细胞分泌的可溶性细胞因子含量(如 IL-10、TGF-β 等),而是影响脐带间充质干细胞细胞外泌体 (human umbilical cord mesenchymal stem cell exosomes, Huc-MSC-exos) 中 miRNA 的表达^[24]。同样地,王琪^[25]研究也发现,培养维度间的差

表 1 外泌体不同提取方法的优缺点

Table 1 Advantages and disadvantages of different extraction methods for extracellular vesicles

提取方法	优点	缺点	文献来源
超速离心法	分离外泌体纯度较高,被称为外泌体提取分离的“金标准”	设备依赖、操作烦琐、耗时长	[13-14]
免疫磁珠法	特异性高、纯度高、不影响外泌体形态	效率低、外泌体内容物的生物活性易受 pH 和盐浓度影响	[15-16]
聚合物沉淀法	操作简便、耗时短	可能会同时分离非囊泡污染物,分离外泌体纯度较低	[17-18]
微流控技术	易于自动化和集成、便携性和纯度高、试剂和样品消耗低	成本高、设备复杂、成品率低	[19-20]
尺寸排阻色谱	操作简便、耗时短、分离外泌体纯度较高	萃取量小、实验室设备要求高	[18, 21]

异除了影响 MSC-exos 产量外,还会影响其内部蛋白质含量。除上述影响因素外,细胞所处环境包括氧化应激、炎症和肿瘤微环境等也会影响 MSC-exos 提取^[26]。综上所述,对 MSC-exos 的提取,需考虑 MSCs 培养条件和所处环境。

(2) MSC-exos 来源 有研究发现,将不同种类 MSCs 接种传统培养瓶中,脐带间充质干细胞(human umbilical cord mesenchymal stem cells, Huc-MSCs)生长更快。并且,在相同提取方法下,其分离的外泌体数量也是其他种类的 4 倍。鉴于其易获取、增殖快及产量高等优点,已被广泛应用于基础研究^[22]。王宪峰等^[27]研究也发现,在使用超速离心法提取 Huc-MSC-exos 与骨髓间充质干细胞外泌体(bone marrow mesenchymal stem cell exosomes, BM-MSC-exos)时, Huc-MSC-exos 无论是产量还是纯度均优于 BM-MSC-exos。而且, Huc-MSC-exos 对骨关节炎的治疗效果优于 BM-MSC-exos,因此 Huc-MSC-exos 更适合作为治疗骨关节炎的新疗法。这也间接表明, MSC-exos 在治疗疾病方面存在靶向性(即与其他 MSC-exos 治疗相比,某种 MSC-exos 在具体疾病治疗效果上更优)。由此可见,在 MSC-exos 治疗肝纤维化方面或许也存在类似现象。近年来, MSC-exos 治疗疾病存在靶向性这一现象也逐渐得到许多研究证实^[28-33]。鉴于不同 MSCs-exos 在提取效果和疾病治疗效果方面有差异,对 MSCs-exos 的提取与治疗均需考虑其来源。

综上所述, MSC-exos 的产量除了与提取方法和离心时间相关外,一定程度上也取决于其亲本 MSCs 的培养方式、所处环境及来源。当然,对于不同 MSCs,其组织分离方法的不一致会导致细胞活性与纯度不同,甚至出现部分细胞损伤等情况,这或许也会影响 MSC-exos 的提取。目前,尚无一种能快速、高效、经济且适

用于大体积样本的外泌体提取方法。因此,该方面的研究仍要继续。

1.2 MSCs-exos 鉴定

1.2.1 外泌体鉴定标准 国际囊泡协会(International Society for Extracellular Vesicles, ISEV)2018 年规定了外泌体鉴定的最低实验要求^[34]。(1) 总体表征:至少 3 个阳性蛋白质(至少包括 1 个跨膜蛋白和 1 个细胞溶质蛋白)和 1 个阴性蛋白质标志物。外泌体阳性蛋白标志物包括跨膜蛋白 CD9、CD63、CD81,以及溶质蛋白 HSP70、Alix、TSG101;外泌体阴性蛋白标志物包括细胞核蛋白 Histone 3、高尔基体蛋白 GM130 和内质网蛋白 Calnexin。(2) 个体表征:利用电镜和纳米颗粒追踪技术(nanoparticle tracking analysis, NTA)观察外泌体峰值大小与形态。(3) 具体鉴定内容:①透射电子显微镜(transmission electron microscope, TEM)分析外泌体形态,大小不等的茶托形或椭圆形双膜结构,中央为低电子密度成分,边界清晰分布集中;②NTA 测粒径分布,外泌体粒径分布峰值为 40~100 nm;③Western blot 检测,有相应阴性与阳性蛋白质表达。

1.2.2 不同 MSC-exos 在鉴定方面存在差异 目前已有研究表明,在对提取的 Huc-MSC-exos 行蛋白质组学分析时发现, Huc-MSCs 与 Huc-MSC-exos 间有一定同质性和差异性。同质性可以直接证明该外泌体确实来源于 Huc-MSCs^[35]。换言之,外泌体中存在某些与其亲本 MSCs 相关的蛋白质,可作为与其他外泌体差异性的表现。还有研究表明,不同 MSC-exos 在治疗 CCl₄ 诱导的肝纤维化时均有疗效,但存在治疗方式这一微小差异。其中,AD-MSC-exos 通过重塑细胞外基质和增强肝细胞增殖改善肝纤维化,而 Huc-MSC-exos 通过抗炎作用改善肝纤维化。使用不同 MSC-exos 治疗同一疾病,其机制上的差异也间接说明,不同来源 MSC-exos 中可能存

在不同特异性物质^[36]。综上所述,不同来源 MSC-exos 除了满足最低鉴定标准(椭圆形双膜结构、粒径分布峰值为 40~100 nm、至少 3 个阳性蛋白质和 1 个阴性蛋白质标志物)外,或许可以找到特异性标志,类似于 MSCs 表面存在的特异性标志物。但目前由于观点不同、实验难度高等问题还不能下定论。因此,为了获得高纯度目的 MSC-exos 及更清晰地了解其表征特性,对不同来源 MSC-exos 特异性标记进行探究是必要的。

2 MSC-exos 治疗肝纤维化的潜在机制

MSC-exos 因来源广泛、免疫原性更低及无致瘤性等优势逐渐被广泛应用。由于引起肝纤维化的因素错综复杂, MSC-exos 治疗肝纤维化的机制也呈现多样性。目前,其治疗主要分为以下方式:(1)通过自身特性(MSC-exos 内部含有非编码 RNA、细胞因子及特异性蛋白质等)直接发挥作用;(2)通过递送药物的方式间接发挥作用。以下对 MSC-exos 直接作用机制及 MSC-exos 的递送作用进行总结。

2.1 MSC-exos 直接作用机制

2.1.1 抑制 HSC 的活化与增殖 HSC 活化与增殖是肝纤维化发生的标志,aHSC 既能通过分泌 TGF-β 维持其活化状态,又能转化为肌成纤维细胞分泌大量细胞外基质,最终发展为肝纤维化。因此,以 HSC 为靶点,调控其活化与增殖是改善肝纤维化策略之一。在 DEN/CCl₄ 诱导的肝纤维化小鼠模型中,AD-MSC-exos 通过抑制 HSC 活化和重塑肝细胞谷氨酰胺合成酶介导的谷氨酰胺和氨代谢,调节肝脏微环境,进而改善肝纤维化^[37]。还有研究表明,将 BM-MSC-exos 移植入 CCl₄ 诱导的大鼠肝纤维化模型后,Wnt 通路中 Wnt3a、β-catenin 等受体蛋白表达下降,COL-I 和 α-SMA 表达降低,这表明 BM-MSC-exos 通过下调 Wnt/β-catenin 信号通路,抑制 HSC 活化进而减轻肝纤维化^[38]。

2.1.2 抑制氧化应激及肝细胞凋亡 研究表明, MSC-exos 能通过保护受损的肝细胞免于异常凋亡及抑制氧化应激来保护肝脏结构和改善肝纤维化。研究人员发现,经 Huc-MSC-exos 治疗后,肝纤维化小鼠肝细胞的氧化应激和细胞凋亡均明显减少。与常用肝保护剂联苯双酯治疗相比,Huc-MSC-exos 具有更明显的抗氧化和肝保护作用^[39]。还有实验表明,AD-MSC-exos 通过下调促凋亡因子 Bax 和下游凋亡执行蛋白 Caspase-3 表达,提高抑凋亡因子 Bcl-2 的表达,使肝细胞凋亡减少,

从而改善肝纤维化^[40]。同样地,郑嵘灵等^[41]研究也证实了 MSC-exos 可能通过 miR-21-5p 直接靶向 PIK3R1 激活 PI3K/AKT 信号通路抑制 BRL 大鼠肝细胞凋亡。然而,也有研究指出, MSC-exos 可抑制肝细胞凋亡,但对氧化应激的调节作用并不明显^[42]。因此, MSC-exos 是否具有该方面作用仍有待进一步研究证实。

2.1.3 调控巨噬细胞表型转化 随着对外泌体研究不断深入,越来越多的证据表明, MSC-exos 可通过调控巨噬细胞表型转化进而恢复肝脏功能。Tian 等^[43]研究发现 MSCs 改善肝纤维化在很大程度上取决于其分泌的外泌体,Huc-MSC-exos 的 miR-148a 通过调控 STAT3 表达抑制 M1 型促炎巨噬细胞并促进 M2 型抗炎巨噬细胞,进而逆转肝纤维化进程。同样地,Hu 等^[44]也发现,来自外泌体中的 miR-142-5p 可通过 CTSB 调节巨噬细胞极化来改善肝纤维化进展。

2.1.4 减少胶原沉积 肝纤维化进展涉及众多机制参与。目前,已有大量研究表明, MSC-exos 可通过减少胶原沉积从而改善肝纤维化。有研究表明,AD-MSC-exos 通过调节 p38 MAPK/NF-κB 通路,使小鼠肝组织 α-SMA 和 COL-I 明显降低进而改善肝纤维化^[45]。Ma 等^[46]研究也发现, BM-MSC-exos 中 circCDK13 通过 miR-17-5p/KAT2B 轴抑制 PI3K/AKT 和 NF-κB 信号通路,抑制胶原沉积与纤维增生,最终提高肝纤维化疗效。同样地,蔡梦洁^[47]在肝脏组织切片染色及蛋白质表达水平检测中也发现, Huc-MSC-exos 中的 miR-373 可显著减少胶原沉积,从而改善肝功能。

2.1.5 其他机制 除了上述常见机制外,还有一些特殊机制,如诱导 HSC 铁死亡和抑制 LSECs 毛细血管化等在改善肝纤维化中也起着一定作用。

近年来发现,谷胱甘肽过氧化物酶 4 (glutathione peroxidase 4, GPX4) 作为铁死亡的关键调控因子在调控肝纤维化中起着一定作用。在小鼠肝纤维化模型中, Huc-MSC-exos 通过递送 BECN1 抑制 xCT/GPX4 通路进而诱导 HSC 的铁死亡以实现肝纤维化逆转。此外,铁自噬和坏死性凋亡也可能在 MSC-exos 调控的 HSC 死亡中发挥作用^[48]。王晨^[49]研究发现, LSECs 毛细血管化可诱导肝窦病理性血管增生,促进肝组织炎症和胶原沉积,是治疗肝纤维化的重要靶点。Huc-MSC-exos 中含有的泛素特异性肽酶 9X (ubiquitin specific peptidase 9X, USP9X) 在体内外试验中均表现出抑制 LSECs 毛细血管化作用。在进一步研究中也证实, Huc-MSC-exos 通过递送 USP9X 抑制 LSECs 毛细血

管化进而减缓肝纤维化进展。

2.2 MSC-exos 的间接作用(以载体递送药物方式治疗肝纤维化)

MSC-exos 不仅拥有其亲代 MSCs 抗肝纤维化的生物活性,还因更低免疫原性和更高稳定性逐渐成为肝纤维化治疗的新策略。更重要的是,外泌体作为天然药物载体,在协同药物改善肝纤维化治疗中也起重要作用。

实验和临床研究均显示奥贝胆酸(Obeticholic acid,OCA)可抑制非酒精性脂肪性肝炎(nonalcoholic steatohepatitis,NASH)肝纤维化。然而,在临床试验研究中,其剂量相关的不良反应和瘙痒限制了NASH肝

纤维化有效治疗剂量的使用^[50-52]。另外,法脂类 X 受体(Farnoid X receptor,FXR)在肾脏和肠道中的高表达导致肝脏对 OCA 的可及性受限,从而导致体内脱靶副作用^[53-54]。有研究表明,将 MSC-exos 作为药物载体可改善上述问题。以 Huc-MSC-exos 为药物载体,通过水浴超声将 OCA 转移至外泌体中,通过激活 FXR 信号通路,增强细胞外基质降解,进而改善肝纤维化。此外,与 Huc-MSC-exos 或 OCA 单独治疗相比,外泌体介导的 OCA 递送在改善肝纤维化方面疗效更好^[55]。

综上所述,外泌体作为天然药物载体,不仅自身具备改善肝纤维化的能力,还通过参与药物递送过程,提升肝纤维化治疗效果,体现了其临床应用价值,见图 2。

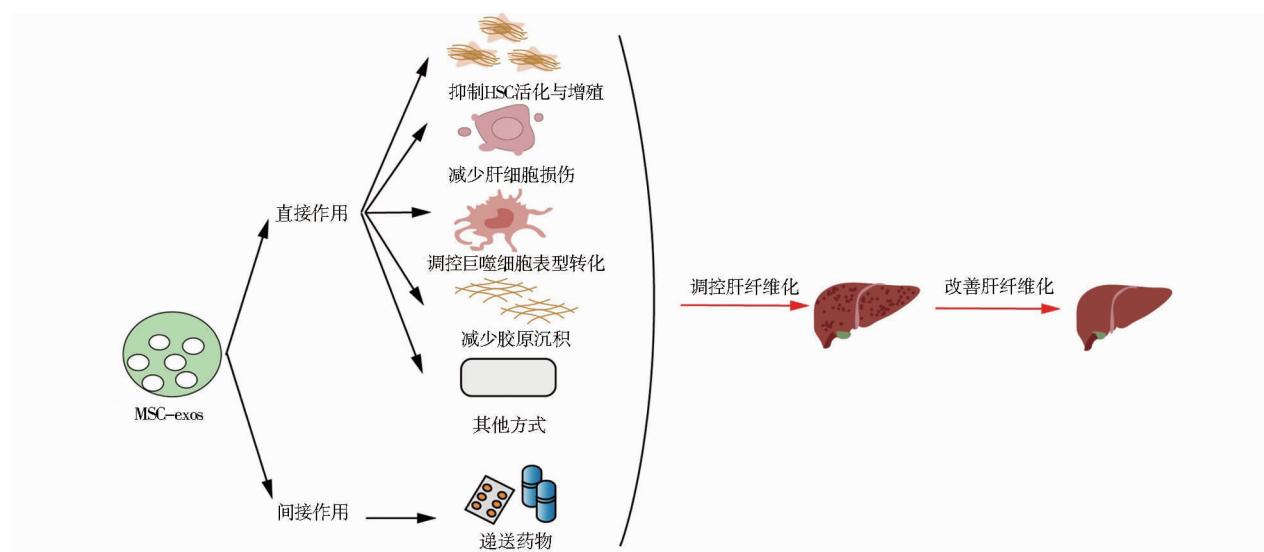


图 2 MSC-exos 治疗肝纤维化的作用方式及潜在机制

Fig. 2 The mode of action and potential mechanisms of mesenchymal stem cell exosomes in the treatment of liver fibrosis

3 提高 MSC-exos 治疗肝纤维化的优化策略

虽然研究表明, MSC-exos 既能依靠自身特性改善肝纤维化,又能作为天然药物递送载体,确保抗纤维化药物的安全运输,但其缺陷也逐渐暴露。首先,当移植 MSC-exos 时,肝脏及具有单核吞噬细胞的脾脏均为未修饰外泌体的靶器官^[56-57],这严重导致外泌体在非特异性器官中积累并造成生物制剂浪费。其次,人的 HSC 约占正常肝脏总驻留细胞的 15%,而大鼠和小鼠的 HSC 分别占肝细胞总数的 5%~8% 和 8%~10%,并且在纤维化损伤肝中可扩增至 15%。由此可见,在人和鼠的肝脏中,HSC 所占比例均较低。综上所述,在

治疗肝纤维化过程中:一方面, MSC-exos 无法充分的靶向肝脏;另一方面,即使 MSC-exos 迁移至肝脏,由于 HSC 占比较低,无法在 aHSC 周围富集有效的治疗浓度,这可能会导致疗效不佳。因此,要增强 MSC-exos 靶向 aHSC 的能力^[58]。除此之外, MSC-exos 载药能力低和产量低也是一个难题。因此,解决上述问题是提高抗肝纤维化作用的策略之一。近年来,研究人员还发现, MSC-exos 联合药物和基因修饰等方式在改善肝纤维化方面更优,这也为肝纤维化治疗提供了新策略。

3.1 MSC-exos 联合基因工程调控肝纤维化(提高靶向 aHSC 能力)

许多研究报道了可用于靶向 aHSC 的修饰,如靶向

VI型胶原蛋白受体的修饰环精氨酸甘氨酸肽^[59-60]、靶向CD44的透明质酸(hyaluronic acid, HA)^[61]和靶向胰岛素样生长因子受体/甘露糖-6磷酸受体的甘露糖-6磷酸^[62]等。然而,这些配体修饰的递送载体受到低积累和严重副作用限制,无法很好的应用于研究。但是近年来,在治疗肝纤维化方面靶向aHSC的新策略已取得了新突破。

已有研究表明,从利用噬菌体展示技术构建的肽库中筛选出aHSC的靶向肽HSTP1并对其进行鉴定,随后将HSTP1与外泌体富集膜蛋白Lamp2b融合,再将融合物通过基因工程技术对外泌体进行修饰。最后研究表明,经HSTP1修饰的Huc-MSC-exos可特异性结合aHSC,从而改善肝纤维化^[58]。You等^[63]研究也表明,将维生素A(vitamin A, VA)衍生物与AD-MSC-exos结合,在该结合物作用下可靶向aHSC。此外,即使使用降低90%剂量含VA衍生物的外泌体与正常剂量的纯外泌体相比,前者抗纤维化效果仍比后者显著,这也证实了该方法具备较高治疗价值及靶向治疗优势。同样地,Zhang等^[64]也研究设计了一种脂质体(liposome, Lip)和外泌体两膜杂交纳米仿生给药系统,该系统同样是通过VA修饰,以aHSCs为靶点,在改善肝纤维化疗效方面得到了提升。

综上所述,通过基因工程技术修饰MSC-exos,使之具备特定细胞的靶向能力,进而提高MSC-exos治疗肝纤维化效果,这对后续疾病精准治疗提供了新策略。

3.2 MSC-exos联合载药技术调控肝纤维化(提高外泌体载药效率)

目前常用的外泌体载药方法以直接装载和间接装载为主。直接装载指药物与外泌体通过转染、电穿孔及超声等方式将药物直接负载于纯化的外泌体中,但可能会面临外泌体聚集和膜损伤等问题^[65-66]。间接装载指先将药物与外泌体供体细胞进行化学转染或共孵育,再经供体细胞分泌得到装载药物的外泌体,但此种方式难以进行人工干预,因此该载药方式的普适性不高。有多项研究表明,在使用室温孵育,电穿孔和温和超声进行同一药物载药效率检测时发现,经温和超声程序可获得更多载药量^[55, 67-68]。因此,或许能以温和超声装载方式,先提高外泌体载药量进而提高抗肝纤维化疗效。但由于肝纤维化领域该方面的研究甚少,希望在不久的将来,能够实现外泌体载药技术突破,为肝纤维化治疗添上浓墨重彩的一笔。

3.3 MSC-exos联合不同提取方式调控肝纤维化(提高外泌体产量)

MSC-exos已被证实能改善肝纤维化,然而因其产量低,在基础研究与临床应用方面受到限制。由上文的总结可知, MSC-exos 提取方式(单独或联合提取法)、MSCs 培养方式、所处环境及来源等均能影响 MSC-exos 的产量与纯度^[11-12, 22-27]。那么,或许可以根据影响 MSC-exos 提取的因素,选择最佳方案,以达到外泌体产量与纯度的最佳平衡,进而提高其抗肝纤维化能力。虽然目前还没有 MSC-exos 联合不同提取方式改善肝纤维化效果优于常规 MSC-exos 治疗的文章,但基于当前的各种研究,相信在未来能够得到证实。

3.4 MSC-exos联合药物调控肝纤维化

近年来,有研究人员发现, MSC-exos 可与部分药物联合使用,使抗肝纤维化能力得到进一步提升,这或许是 MSC-exos 治疗肝纤维化的一大新策略。

目前,卢帕他定(rupatadine, RUP)因具备抗肝纤维化能力被广泛研究。据报道,与 BM-MSC-exos 单独治疗相比,联合 RUP 治疗可提高机体抗炎、抗氧化作用,进而改善肝纤维化^[69]。Ellakany 等^[70]研究也发现,与 MSC-exos 或吡喹酮(praziquantel, PZQ)单独治疗相比,两者联合治疗可进一步减少肉芽肿数量与抑制炎症,最终提高抗肝纤维化疗效。同样地,外泌体联合木犀草素、OCA 及羟氯喹也同样展现出联合治疗的独特优势^[55, 64, 68]。综上所述,与 MSC-exos 或药物单独治疗相比, MSC-exos 联合药物治疗效果更优。因此, MSC-exos 联合药物治疗方案可为后续肝纤维化治疗提供参考。

3.5 MSC-exos联合基因修饰调控肝纤维化

MSC-exos 内容物包括非编码 RNA、蛋白质和脂质等,这些成分使其具有介导细胞间通信和相互作用的独特性^[71]。由研究表明,外泌体中的非编码 RNA 对肝纤维化的改善具有重要作用^[72-73]。可见,在非编码 RNA 层面进一步修饰 MSC-exos 后,抗肝纤维化能力或许将得到进一步提升。

3.5.1 微小 RNA 修饰外泌体调控肝纤维化 微小 RNA(microRNA, miRNA)主要经 RNA 聚合酶Ⅱ转录而成,与细胞质中的 mRNA 结合后可导致 mRNA 降解或阻断蛋白质翻译,从而参与细胞增殖、细胞凋亡、物质代谢和细胞分化等生理病理过程^[74]。越来越多的研究表明,miRNA 通过调节基因或蛋白质表达调控肝纤维化进程。

与 AD-MSC-exos 单独治疗相比,过表达 miR-122 的 AD-MSC-exos 既能抑制 HSC 活化、减少胶原沉积,又能够以药物载体的方式介导 miR-122 与 HSC 间的通信,提高其药物递送能力,使抗肝纤维化能力得到进一步提升^[75]。同样地,过表达 miR-181-5p 的 AD-MSC-exos 在治疗肝纤维化方面也优于 AD-MSC-exos 单独治疗^[76]。

3.5.2 环状 RNA 修饰外泌体调控肝纤维化 环状 RNA (circular RNA, circRNA) 在各种物种中广泛表达。此外,相对于其他类型的 RNA,它们稳定性、特异性和组织化程度更高^[77]。越来越多的证据表明, circRNA 在 MSC-exos 治疗肝纤维化中起重要作用。

在 CCl₄ 诱导的小鼠肝纤维化模型中,经 mmu-circ-0000623 修饰的 AD-MSC-exos 改善肝纤维化的效果优于 AD-MSC-exos 的常规治疗,其机制是通过调节 miR-125/ATG4D 途径促进自噬激活,进而改善肝纤维化^[78]。最近有研究还发现,过表达 circCDK13 的 BM-MSC-exos 在改善肝纤维化疗效方面也有所提升^[46]。综上所述,与 MSC-exos 单独治疗相比,经非编码 RNA 修饰的 MSC-exos 在肝纤维化治疗方面疗效较显著,这也为抗肝纤维化治疗提供了新策略。

表 2 基于联合治疗提高 MSC-exos 抗肝纤维化能力的策略

Table 2 Strategies for improving the anti liver fibrosis ability of MSC exos based on combination therapy

方式	作者	外泌体	具体方法	机制与内容
基因工程	Lin 等 ^[58]	Huc-MSC-exos	提高靶向 aHSC 能力	通过提高靶向 aHSC 能力,使外泌体在 HSC 周围富集,使抗肝纤维化能力得到进一步提升
	You 等 ^[63]	AD-MSC-exos		
	Zhang 等 ^[64]	BM-MSC-exos		
载药技术	Ashour 等 ^[68]	BM-MSC-exos	提高外泌体载药效率	针对不同药物,使用最佳载药技术,通过提高 MSC-exos 的载药效率,可增强肝纤维化的疗效
提取方式	-	-	提高外泌体产量	针对不同疾病,选择最佳 MSC-exos 提取方式(单独或联合提取法)、MSCs 培养方式、所处环境及来源,通过提高外泌体产量,可改善肝功能
联合药物	Didamoony 等 ^[69]	BM-MSC-exos	卢帕他定	抑制 PAF/RIPK3 和 TGF-β1/hedgehog 信号通路,以达到抗炎、抗氧化,进而改善肝纤维化
	Ellakany 等 ^[70]	BM-MSC-exos	吡喹酮	BM-MSC-exos 增强了吡喹酮的治疗效果
	Ashour 等 ^[68]	BM-MSC-exos	木犀草素	经水浴超声提升外泌体负载木犀草素的效率进而提高抗肝纤维化疗效
	Azizoltani 等 ^[55]	Huc-MSC-exos	奥比胆酸	激活 FXR 信号通路,增强细胞外基质降解
基因修饰	Zhang 等 ^[64]	BM-MSC-exos	羟氯喹	与 MSC-exos 协同抑制自噬,减少细胞外基质沉积,进而改善肝纤维化
	蔡梦洁 ^[47]	Huc-MSC-exos	过表达 miR-373	过表达 miR-373 下调 LX-2 细胞 TGF-βR2 表达和胶原合成
	Lou 等 ^[75]	AD-MSC-exos	经 miR-122 修饰	经 miR-122 修饰后的 AD-MSC-exos 抑制 HSC 活化和减少胶原沉积以改善肝纤维化

3.6 MSC-exos 联合其他方式调控肝纤维化

MSC-exos 除了以上联合方式外,还有其他途径也能起相似的作用,如 MSC-exos 过表达 HGF 和 MSC-exos 预处理等。

Yu 等^[79]研究表明,过表达 HGF(即 AD-MSCHGF-exos)的 AD-MSC-exos 能提高 ALB、CK-18 和 HNF4α 表达,并且其疗效优于常规 MSC-exos 治疗。同样地,经 γ 干扰素(interferon gamma-γ, IFN - γ)预处理的 BM-MSC-exos 能更快修复肝脏组织,提高抗纤维化疗效^[80]。

综上所述,通过分析 MSC-exos 治疗肝纤维化方面存在的阻碍,包括 MSC-exos 载药能力低、产量小及靶向 aHSC 能力弱等问题,采取不同方式解决其现有问题进而提高机体抗肝纤维化能力,是目前 MSC-exos 作为治疗肝纤维化优化策略的探究要点。此外,目前已有较多研究表明,与 MSC-exos 单独治疗相比, MSC-exos 联合其他方式治疗肝纤维化效果更显著,这也为肝纤维化治疗提供了新策略。但这些方式本身对细胞、组织或机体是否具有危害性是目前尚未研究透彻的。文章总结了通过联合治疗提高 MSC-exos 治疗肝纤维化的策略,见表 2。

(续表2)

方式	作者	外泌体	具体方法	机制与内容
Qu 等 ^[76]	AD-MSC-exos	经 miR-181-5p 修饰	抑制 STAT3/Bcl-2/Beclin 1 途径增加自噬,进而减轻肝纤维化	
Zhu 等 ^[78]	AD-MSC-exos	经 mmu-circ-0000623 修饰	调节 miR-125/ATG4D 途径促进自噬激活,进而改善肝纤维化	
Ma 等 ^[46]	BM-MSC-exos	过表达 circCDK13	过表达 circCDK13 的 BM-MSC-exos 通过 miR-17-5p/KAT2B 轴调节 MFGE8 表达改善肝纤维化	
其他方式	Yu 等 ^[79]	AD-MSC-exos	过表达 HGF	外泌体使 ALB、CK-18 和 HNF4α 的表达上调,α-SMA 的表达下调,进而减轻肝纤维化
Takeuchi 等 ^[80]	BM-MSC-exos	IFN-γ 预处理	经 IFN-γ 预处理后,能促进巨噬细胞的抗炎作用进而修复肝脏	
曾韬 ^[81]	Huc-MSC-exos	α-2,6-唾液酸糖基化修饰	在糖基化修饰作用下,既能抑制 HSC 活化又能减少肝细胞凋亡,进而减轻肝纤维化并促进正常肝细胞增殖	

4 总结与展望

MSC-exos 携带来自亲本细胞的生物分子并作为细胞间通信载体,逐渐成为治疗多种疾病的一种新策略。如今,许多研究已证明天然 MSC-exos 的抗纤维化特性,表明它们具备作为肝纤维化治疗剂的潜力。既往研究人员对 MSC-exos 治疗肝纤维化的机制进行了大量研究,但并没有根据 MSC-exos 治疗方式不同对其进行分类。此外,前期研究人员将重心主要放在 MSC-exos 不同的单一提取方法上,很少有人重视不同组合式提取法、MSCs 培养方式和来源不同等带来的提取效果的差异。再者,很多研究人员面对 MSC-exos 治疗肝纤维化的种种阻碍,并没有全方位考虑其进一步的优化策略。

因此,针对上述问题,结合国内外基于 MSC-exos 治疗肝纤维化的研究,本文首次综述了以下内容。首先,以不同角度分析 MSC-exos 的提取,强调为了获得纯度高、产量大的外泌体,不能只考虑单一提取方法上的差异性,也要考虑不同组合提取法、MSCs 培养方式、所处环境和来源间的差异。其次,通过对 MSC-exos 鉴定方式的分析,提出猜想:不同 MSC-exos 在满足最低鉴定标准(椭圆形双膜结构、粒径分布峰值为 40~100 nm、至少 3 个阳性蛋白质和 1 个阴性蛋白质标志物)外,可能还存在特异性物质或标志物。再次,对常见 MSC-exos 治疗肝纤维化方式及机制进行了总结,帮助研究人员快速了解 MSC-exos 治疗肝纤维化的研究现状。最后,通过分析 MSC-exos 治疗肝纤维化遇到的阻碍,提出提高 MSC-exos 治疗肝纤维化的优化策略,不仅为刚踏入 MSC-exos 治疗肝纤维化领域的研究人员提供了一份全面资料,也为提高肝纤维化疗效提供了许多

新策略。

然而, MSC-exos 内容物的复杂性与多样性,再加上实验操作上的困难性,无法准确检测出 MSC-exos 治疗肝纤维化过程中具体有哪些物质参与其中。面对外泌体产量低、载药能力低和靶向能力弱等问题,虽然文章提供了相应策略,但方法与结论仍需反复推敲。MSC-exos 在治疗肝纤维化方面还存在以下问题待解决,即 MSC-exos 治疗肝纤维化的给药剂量、给药方式、多次给药的免疫排斥、疗效持续时间等。相信在不久的将来,通过科研人员与临床医生的不懈努力,为 MSC-exos 治疗肝纤维化扫除障碍,给肝脏疾病患者带来福音。

参考文献

- [1] Saeed A, Bartuzi P, Heegsma J, et al. Impaired hepatic vitamin A metabolism in NAFLD mice leading to vitamin A accumulation in hepatocytes. *Cellular and Molecular Gastroenterology and Hepatology*, 2021, 11(1): 309-325.e3.
- [2] Lee C B, Kim M, Han J, et al. Mesenchymal stem cells influence activation of hepatic stellate cells, and constitute a promising therapy for liver fibrosis. *Biomedicines*, 2021, 9(11): 1598.
- [3] Guo Y, Chen B, Chen L J, et al. Current status and future prospects of mesenchymal stem cell therapy for liver fibrosis. *Journal of Zhejiang University: Science B*, 2016, 17 (11): 831-841.
- [4] Lou G H, Chen Z, Zheng M, et al. Mesenchymal stem cell-derived exosomes as a new therapeutic strategy for liver diseases. *Experimental & Molecular Medicine*, 2017, 49(6): e346.
- [5] Evers M J W, van de Wakker S I, de Groot E M, et al. Functional siRNA delivery by extracellular vesicle-liposome hybrid nanoparticles. *Advanced Healthcare Materials*, 2022, 11 (5): e2101202.

- [6] Doyle L M, Wang M Z. Overview of extracellular vesicles, their origin, composition, purpose, and methods for exosome isolation and analysis. *Cells*, 2019, 8(7) : 727.
- [7] Cheng L L, Zhang X G, Tang J J, et al. Gene-engineered exosomes-thermosensitive liposomes hybrid nanovesicles by the blockade of CD47 signal for combined photothermal therapy and cancer immunotherapy. *Biomaterials*, 2021, 275 : 120964.
- [8] Sun L N, Fan M R, Huang D, et al. Clodronate-loaded liposomal and fibroblast-derived exosomal hybrid system for enhanced drug delivery to pulmonary fibrosis. *Biomaterials*, 2021, 271 : 120761.
- [9] Piffoux M, Silva A K A, Wilhelm C, et al. Modification of extracellular vesicles by fusion with liposomes for the design of personalized biogenic drug delivery systems. *ACS Nano*, 2018, 12(7) : 6830-6842.
- [10] Yu L L, Zhu J, Liu J X, et al. A comparison of traditional and novel methods for the separation of exosomes from human samples. *BioMed Research International*, 2018, 2018 : 3634563.
- [11] Zhao A G, Shah K, Cromer B, et al. Comparative analysis of extracellular vesicles isolated from human mesenchymal stem cells by different isolation methods and visualisation of their uptake. *Experimental Cell Research*, 2022, 414(2) : 113097.
- [12] Stam J, Bartel S, Bischoff R, et al. Isolation of extracellular vesicles with combined enrichment methods. *Journal of Chromatography B, Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 2021, 1169 : 122604.
- [13] Kurian T K, Banik S, Gopal D, et al. Elucidating methods for isolation and quantification of exosomes: a review. *Molecular Biotechnology*, 2021, 63(4) : 249-266.
- [14] Colao I L, Corteling R, Bracewell D, et al. Manufacturing exosomes: a promising therapeutic platform. *Trends in Molecular Medicine*, 2018, 24(3) : 242-256.
- [15] Sun J W, Chen Z, Tian K W, et al. Magnetic bead-based adsorption strategy for exosome isolation. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 2022, 10 : 942077.
- [16] Patil S M, Sawant S S, Kunda N K. Exosomes as drug delivery systems: a brief overview and progress update. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 2020, 154 : 259-269.
- [17] Tiwari S, Kumar V, Randhawa S, et al. Preparation and characterization of extracellular vesicles. *American Journal of Reproductive Immunology*, 2021, 85(2) : e13367.
- [18] Abhange K, Makler A, Wen Y, et al. Small extracellular vesicles in cancer. *Bioactive Materials*, 2021, 6(11) : 3705-3743.
- [19] 韩杰, 葛安, 马晓霞, 等. 外泌体提取及保存技术研究进展. *中国细胞生物学学报*, 2021, 43(2) : 451-459.
- Han J, Ge A, Ma X X, et al. Research progress on the isolation and preservation techniques of exosomes. *Chinese Journal of Cell Biology*, 2021, 43(2) : 451-459.
- [20] Shirejini S Z, Inci F. The Yin and Yang of exosome isolation methods: conventional practice, microfluidics, and commercial kits. *Biotechnology Advances*, 2022, 54 : 107814.
- [21] Sidhom K, Obi P O, Saleem A. A review of exosomal isolation methods: is size exclusion chromatography the best option? *International Journal of Molecular Sciences*, 2020, 21(18) : 6466.
- [22] Haraszti R A, Miller R, Stoppato M, et al. Exosomes produced from 3D cultures of MSCs by tangential flow filtration show higher yield and improved activity. *Molecular Therapy*, 2018, 26(12) : 2838-2847.
- [23] 张亚萍. 负载三维培养脐带间充质干细胞外泌体的卵巢基质凝胶治疗化疗所致卵巢损伤的研究. 济南: 山东大学, 2023. Zhang Y P. Study of ovarian ECM gel loaded with 3D-UC-MSC-exos for ovarian reserve against chemotherapy-induced injury. Jinan: Shandong University, 2023.
- [24] 吴杰. 低氧培养人脐带间充质干细胞后分泌的外泌体对小鼠过敏性鼻炎的治疗作用及其机制. 南昌: 南昌大学, 2022. Wu J. Therapeutic effect and mechanism of the exosomes secreted from human umbilical cord mesenchymal stem cells cultured with hypoxia on allergic rhinitis in mice. Nanchang: Nanchang University, 2022.
- [25] 王琪. 三维培养的人脐带间充质干细胞来源外泌体在白癜风治疗中的作用和机制研究. 西安: 中国人民解放军空军军医大学, 2022. Wang Q. Role and mechanism of exosomes derived from three-dimensional cultured human umbilical cord mesenchymal stem cells in the treatment of vitiligo. Xi'an: Chinese People's Liberation Army Air Force Medical University, 2022.
- [26] Jafari D, Malih S, Eini M, et al. Improvement, scaling-up, and downstream analysis of exosome production. *Critical Reviews in Biotechnology*, 2020, 40(8) : 1098-1112.
- [27] 王宪峰, 欧昕, 邓必勇. 不同来源间充质干细胞外泌体治疗骨关节炎疗效的比较. *中国组织工程研究*, 2022, 26(25) : 3980-3985.
- Wang X F, Ou X, Deng B Y. Comparison of effects of exosomes secreted by different mesenchymal stem cells for the treatment of osteoarthritis. *Chinese Journal of Tissue Engineering Research*, 2022, 26(25) : 3980-3985.
- [28] Cai J X, Wu J Y, Wang J M, et al. Extracellular vesicles derived from different sources of mesenchymal stem cells: therapeutic effects and translational potential. *Cell & Bioscience*, 2020, 10 : 69.
- [29] Deng H M, Zhu L N, Zhang Y G, et al. Differential lung protective capacity of exosomes derived from human adipose tissue, bone marrow, and umbilical cord mesenchymal stem cells

- in sepsis-induced acute lung injury. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2022, 2022: 7837837.
- [30] Soni N, Gupta S, Rawat S, et al. MicroRNA-enriched exosomes from different sources of mesenchymal stem cells can differentially modulate functions of immune cells and neurogenesis. *Biomedicines*, 2021, 10(1): 69.
- [31] Pomatto M, Gai C, Negro F, et al. Differential therapeutic effect of extracellular vesicles derived by bone marrow and adipose mesenchymal stem cells on wound healing of diabetic ulcers and correlation to their cargoes. *International Journal of Molecular Sciences*, 2021, 22(8): 3851.
- [32] Chen S W, Wang Y B, Liao L M, et al. Similar repair effects of human placenta, bone marrow mesenchymal stem cells, and their exosomes for damaged SVOG ovarian granulosa cells. *Stem Cells International*, 2020, 2020: 8861557.
- [33] Semerci Sevimli T, Sevimli M, Qomi Ekenel E, et al. Comparison of exosomes secreted by synovial fluid-derived mesenchymal stem cells and adipose tissue-derived mesenchymal stem cells in culture for microRNA-127-5p expression during chondrogenesis. *Gene*, 2023, 865: 147337.
- [34] Théry C, Witwer K W, Aikawa E, et al. Minimal information for studies of extracellular vesicles 2018 (MISEV2018): a position statement of the International Society for Extracellular Vesicles and update of the MISEV2014 guidelines. *Journal of Extracellular Vesicles*, 2018, 7(1): 1535750.
- [35] 单政铭, 陶述春, 胡春梅, 等. 人脐带间充质干细胞来源外泌体的提取、鉴定和蛋白组学分析. *中国组织工程研究*, 2022, 26(19): 3036-3042.
- Shan Z M, Tao S C, Hu C M, et al. Extraction, identification and proteomic analysis of exosomes derived from human umbilical cord mesenchymal stem cells. *Chinese Journal of Tissue Engineering Research*, 2022, 26(19): 3036-3042.
- [36] Gupta S, Pinky, Vishal, et al. Comparative evaluation of anti-fibrotic effect of tissue specific mesenchymal stem cells derived extracellular vesicles for the amelioration of CCl_4 induced chronic liver injury. *Stem Cell Reviews and Reports*, 2022, 18(3): 1097-1112.
- [37] Wu B T, Feng J X, Guo J Y, et al. ADSCs-derived exosomes ameliorate hepatic fibrosis by suppressing stellate cell activation and remodeling hepatocellular glutamine synthetase-mediated glutamine and ammonia homeostasis. *Stem Cell Research & Therapy*, 2022, 13(1): 494.
- [38] Rong X L, Liu J Z, Yao X, et al. Human bone marrow mesenchymal stem cells-derived exosomes alleviate liver fibrosis through the Wnt/ β -catenin pathway. *Stem Cell Research & Therapy*, 2019, 10(1): 98.
- [39] Jiang W Q, Tan Y W, Cai M J, et al. Human umbilical cord MSC-derived exosomes suppress the development of CCl_4 -induced liver injury through antioxidant effect. *Stem Cells International*, 2018, 2018: 6079642.
- [40] 游茂春, 刘广益, 程俊, 等. 脂肪干细胞及其外泌体减轻肝细胞凋亡改善大鼠肝纤维化. *中国比较医学杂志*, 2020, 30(7): 30-37.
- You M C, Liu G Y, Cheng J, et al. Adipose stem cells and their derived exosomes alleviate liver fibrosis in rats by reducing apoptosis. *Chinese Journal of Comparative Medicine*, 2020, 30(7): 30-37.
- [41] 郑嵘昊, 邓泽润, 韩丹, 等. 骨髓间充质干细胞来源外泌体调节大鼠肝细胞凋亡的机制. *中国组织工程研究*, 2024, 28(1): 44-49.
- Zheng R J, Deng Z R, Han D, et al. Mechanism underlying rat hepatocyte apoptosis regulated by exosomes derived from bone marrow mesenchymal stem cells. *Chinese Journal of Tissue Engineering Research*, 2024, 28(1): 44-49.
- [42] Tan C Y, Lai R C, Wong W, et al. Mesenchymal stem cell-derived exosomes promote hepatic regeneration in drug-induced liver injury models. *Stem Cell Research & Therapy*, 2014, 5(3): 76.
- [43] Tian S Y, Zhou X, Zhang M, et al. Mesenchymal stem cell-derived exosomes protect against liver fibrosis via delivering miR-148a to target KLF6/STAT3 pathway in macrophages. *Stem Cell Research & Therapy*, 2022, 13(1): 330.
- [44] Hu Z Q, Zhao Y P, Jiang J, et al. Exosome-derived miR-142-5p from liver stem cells improves the progression of liver fibrosis by regulating macrophage polarization through CTSB. *Environmental Toxicology*, 2023, 38(8): 1860-1873.
- [45] Gan L H, Zheng L, Yao L, et al. Exosomes from adipose-derived mesenchymal stem cells improve liver fibrosis by regulating the miR-20a-5p/TGFBR2 axis to affect the p38 MAPK/NF- κ B pathway. *Cytokine*, 2023, 172: 156386.
- [46] Ma J, Li Y, Chen M X, et al. hMSCs-derived exosome circCDK13 inhibits liver fibrosis by regulating the expression of MFGE8 through miR-17-5p/KAT2B. *Cell Biology and Toxicology*, 2023, 39(2): 1-22.
- [47] 蔡梦洁. HucMSC 来源的外泌体转运 miR-373 和 Let-7b 缓解肝纤维化. 镇江: 江苏大学, 2018.
- Cai M J. Role and mechanism of hucMSC-ex derived miR-373 and let-7b in liver fibrosis. Zhenjiang: Jiangsu University, 2018.
- [48] Tan Y W, Huang Y, Mei R, et al. HucMSC-derived exosomes delivered BECN1 induces ferroptosis of hepatic stellate cells via regulating the xCT/GPX4 axis. *Cell Death & Disease*, 2022, 13: 319.
- [49] 王晨. 人脐带间质干细胞外泌体转运 USP9X 抑制肝窦内皮细胞毛细血管化缓解肝纤维化. 镇江: 江苏大学, 2022.

- Wang C. Human umbilical cord mesenchymal stem cells derived exosomes transport USP9X to inhibit liver sinusoidal endothelial cells capillarization and alleviate liver fibrosis. Zhenjiang: Jiangsu University, 2022.
- [50] Shah R A, Kowdley K V. Obeticholic acid for the treatment of nonalcoholic steatohepatitis. *Expert Review of Gastroenterology & Hepatology*, 2020, 14(5): 311-321.
- [51] Hindson J. Obeticholic acid for the treatment of NASH. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*, 2020, 17: 66.
- [52] Younossi Z M, Stepanova M, Nader F, et al. Obeticholic acid impact on quality of life in patients with nonalcoholic steatohepatitis: regenerate 18-month interim analysis. *Clinical Gastroenterology and Hepatology*, 2022, 20 (9): 2050-2058.e12.
- [53] Jiang L Y, Zhang H J, Xiao D S, et al. Farnesoid X receptor (FXR): structures and ligands. *Computational and Structural Biotechnology Journal*, 2021, 19: 2148-2159.
- [54] Zivko C, Witt F, Koeberle A, et al. Formulating elafibranor and obeticholic acid with phospholipids decreases drug-induced association of SPARC to extracellular vesicles from LX-2 human hepatic stellate cells. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 2023, 182: 32-40.
- [55] Azizsoltani A, Hatami B, Zali M R, et al. Obeticholic acid-loaded exosomes attenuate liver fibrosis through dual targeting of the FXR signaling pathway and ECM remodeling. *Biomedicine & Pharmacotherapy = Biomedecine & Pharmacotherapie*, 2023, 168: 115777.
- [56] Wan Z, Zhao L B, Lu F, et al. Mononuclear phagocyte system blockade improves therapeutic exosome delivery to the myocardium. *Theranostics*, 2020, 10(1): 218-230.
- [57] Parada N, Romero-Trujillo A, Georges N, et al. Camouflage strategies for therapeutic exosomes evasion from phagocytosis. *Journal of Advanced Research*, 2021, 31: 61-74.
- [58] Lin Y, Yan M C, Bai Z T, et al. Huc-MSC-derived exosomes modified with the targeting peptide of aHSCs for liver fibrosis therapy. *Journal of Nanobiotechnology*, 2022, 20(1): 432.
- [59] Hao Y M, Song K C, Tan X C, et al. Reactive oxygen species-responsive polypeptide drug delivery system targeted activated hepatic stellate cells to ameliorate liver fibrosis. *ACS Nano*, 2022, 16(12): 20739-20757.
- [60] Ji D, Wang Q H, Zhao Q, et al. Co-delivery of miR-29b and germacrone based on cyclic RGD-modified nanoparticles for liver fibrosis therapy. *Journal of Nanobiotechnology*, 2020, 18 (1): 86.
- [61] Li W H, Zhou C C, Fu Y, et al. Targeted delivery of hyaluronic acid nanomicelles to hepatic stellate cells in hepatic fibrosis rats. *Acta Pharmaceutica Sinica B*, 2020, 10(4): 693-710.
- [62] Dutta R, Kumar V, Peng Y, et al. Pharmacokinetics and biodistribution of GDC-0449 loaded micelles in normal and liver fibrotic mice. *Pharmaceutical Research*, 2017, 34 (3): 564-578.
- [63] You D G, Oh B H, Nguyen V Q, et al. Vitamin A-coupled stem cell-derived extracellular vesicles regulate the fibrotic cascade by targeting activated hepatic stellate cells *in vivo*. *Journal of Controlled Release*, 2021, 336: 285-295.
- [64] Zhang Y W, Hou L S, Xing J H, et al. Two-membrane hybrid nanobiomimetic delivery system for targeted autophagy inhibition of activated hepatic stellate cells to synergistically treat liver fibrosis. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 2023. DOI: 10.1021/acsmi.3c11046.
- [65] Lee J, Lee H, Goh U, et al. Cellular engineering with membrane fusogenic liposomes to produce functionalized extracellular vesicles. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 2016, 8 (11): 6790-6795.
- [66] Hood J L, Scott M J, Wickline S A. Maximizing exosome colloidal stability following electroporation. *Analytical Biochemistry*, 2014, 448: 41-49.
- [67] Kim M S, Haney M J, Zhao Y L, et al. Development of exosome-encapsulated paclitaxel to overcome MDR in cancer cells. *Nanomedicine*, 2016, 12(3): 655-664.
- [68] Ashour A A, El-Kamel A H, Mehanna R A, et al. Luteolin-loaded exosomes derived from bone marrow mesenchymal stem cells: a promising therapy for liver fibrosis. *Drug Delivery*, 2022, 29(1): 3270-3280.
- [69] Didamoony M A, Atwa A M, Ahmed L A. Modulatory effect of rupatadine on mesenchymal stem cell-derived exosomes in hepatic fibrosis in rats: a potential role for miR-200a. *Life Sciences*, 2023, 324: 121710.
- [70] Ellakany A R, El Baz H, Shoheib Z S, et al. Stem cell-derived exosomes as a potential therapy for schistosomal hepatic fibrosis in experimental animals. *Pathogens and Global Health*, 2023: 1-21.
- [71] Willms E, Johansson H J, Mäger I, et al. Cells release subpopulations of exosomes with distinct molecular and biological properties. *Scientific Reports*, 2016, 6: 22519.
- [72] Du Z Y, Wu T C, Liu L S, et al. Extracellular vesicles-derived miR-150-5p secreted by adipose-derived mesenchymal stem cells inhibits CXCL1 expression to attenuate hepatic fibrosis. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 2021, 25(2): 701-715.
- [73] Kim J, Lee C B, Shin Y, et al. sEVs from tonsil-derived mesenchymal stromal cells alleviate activation of hepatic stellate cells and liver fibrosis through miR-486-5p. *Molecular Therapy*, 2021, 29(4): 1471-1486.
- [74] Qian G E, Morral N. Role of non-coding RNAs on liver metabolism and NAFLD pathogenesis. *Human Molecular Genetics*, 2022, 31(R1): R4-R21.

- [75] Lou G H, Yang Y, Liu F F, et al. MiR-122 modification enhances the therapeutic efficacy of adipose tissue-derived mesenchymal stem cells against liver fibrosis. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 2017, 21(11) : 2963-2973.
- [76] Qu Y, Zhang Q D, Cai X B, et al. Exosomes derived from miR-181-5p-modified adipose-derived mesenchymal stem cells prevent liver fibrosis via autophagy activation. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 2017, 21(10) : 2491-2502.
- [77] Vo J N, Cieslik M, Zhang Y J, et al. The landscape of circular RNA in cancer. *Cell*, 2019, 176(4) : 869-881.e13.
- [78] Zhu M, Liu X, Li W, et al. Exosomes derived from mmu_circ_0000623-modified ADSCs prevent liver fibrosis via activating autophagy. *Human & Experimental Toxicology*, 2020, 39(12) : 1619-1627.
- [79] Yu L, Xue J C, Wu Y Y, et al. Therapeutic effect of exosomes derived from hepatocyte-growth-factor-overexpressing adipose mesenchymal stem cells on liver injury. *Folia Histochemica et Cytopathologica*, 2023, 61(3) : 160-171.
- [80] Takeuchi S, Tsuchiya A, Iwasawa T, et al. Small extracellular vesicles derived from interferon- γ pre-conditioned mesenchymal stromal cells effectively treat liver fibrosis. *NPJ Regenerative Medicine*, 2021, 6 : 19.
- [81] 曾韬. uMSC 外泌体治疗肝纤维化的糖基化修饰相关机制及其转化应用的关键技术研究. 上海: 中国人民解放军海军军医大学, 2019.
Zeng T. Study on the glycosylation-related mechanisms of uMSC exosome in the treatment of hepatic fibrosis and the key technologies of its translational applications. Shanghai: Naval Medical University of the People's Liberation Army of China, 2019.

Mechanism and Optimization Strategy of Mesenchymal Stem Cell Exosomes against Liver Fibrosis

ZHOU Xiaolei^{1,2} XU Yan^{1,2} JIN Yu¹ YE Junsong^{2,3,4,5}

(1 Gannan Medical University, Ganzhou 341000, China)

(2 Stem Cell Clinical Transformation Branch of the First Affiliated Hospital of Gannan Medical University, Ganzhou 341000, China)

(3 Ganzhou Key Laboratory of Stem Cells and Regenerative Medicine, Ganzhou 341000, China)

(4 Key Laboratory of Medical Tissue Engineering Materials and Biomanufacturing in Jiangxi Province, Gannan Medical University, Ganzhou 341000, China)

(5 Key Laboratory of Cardiovascular and Cerebrovascular Disease Prevention and Treatment of Gannan Medical University of Ministry of Education, Ganzhou 341000, China)

Abstract Liver fibrosis is a major problem in the treatment of liver disease. Mesenchymal stem cells can be used to treat liver fibrosis, but are limited by their potential carcinogenicity, and the large number of cells required for transplantation. In recent years, mesenchymal stem cell exosomes have become a research hotspot due to their smaller size, lower immunogenicity and non-carcinogenicity. However, the clinical application of mesenchymal stem cell exosomes is limited for the following reasons. First, there is a lack of standard and uniform methods for extracting and identifying exosomes from different types of mesenchymal stem cells. Second, the mechanism of mesenchymal stem cell exosomes to treat liver fibrosis is not clear. Finally, mesenchymal stem cell exosome therapy has some problems such as weak ability to target aHSC, low exosome production, low drug loading ability and low delivery efficiency. In view of the above reasons, the factors causing the difference in exosome extraction effect of common mesenchymal stem cells, the mechanism of mesenchymal stem cell exosomes ameliorating liver fibrosis and its optimization strategy were reviewed, providing new understanding and new ideas for the treatment of liver fibrosis by mesenchymal stem cell exosomes.

Key words Mesenchymal stem cell exosomes Hepatic fibrosis Mechanism Optimization strategy