

·综述·

DOI: 10.13865/j.cnki.cjbmb.2018.07.07

间充质干细胞来源的外泌体的特性及其在疾病治疗中的作用

李子建, 冯娟*

(中国医科大学附属盛京医院神经内科, 沈阳 110004)

摘要 外泌体(exosomes)是细胞主动向外环境中分泌的纳米囊泡结构,通常直径在100纳米以下。外泌体是来源细胞与靶细胞之间的物质交换和信息交流的新型载体,可以携带效应分子直接被周围细胞摄取或经血液循环至全身,在正常的生理过程或疾病的发生发展中发挥精细的调控作用。作为一种旁分泌介质,间充质干细胞(mesenchymal stem cell, MSC)来源的外泌体(MSC-exosomes)能够起到与干细胞相似的生理作用。MSC-exosomes所携带的生物活性蛋白质、脂质及DNA、mRNA和非编码RNA等生物活性物质,可能是MSC发挥治疗作用的重要机制之一。本文针对外泌体的生物学来源和近年来MSC-exosomes的标志物与特异性内容物在产生释放、提取鉴定和生物学功能等方面的研究,以及未来的应用前景进行综述,有利于研究者们在该领域开展更深入的研究。

关键词 外泌体; 间充质干细胞; 组织修复; 免疫调节; 纳米载体

中图分类号 Q291; Q734; Q74

Characteristics of Exosomes Derived from Mesenchymal Stem Cells and Their Roles in Disease Treatment

LI Zi-Jian, FENG Juan*

(Department of Neurology, Shengjing Hospital of China Medical University, Shenyang 110004, China)

Abstract Exosomes are nano-vesicular structures that are actively secreted to the external environment by cells. In common, the diameter of the exosomes is below 100 nm. It is a new type of carriers for material exchange and information communication between original cells and target cells. Exosomes can be taken up by the surrounding cells directly or through the blood circulation to reach everywhere of the body. Exosomes play a regulatory role in both normal physiological processes and disease occurrence and progression. As a kind of paracrine mediator, exosomes derived from mesenchymal stem cells (MSC-exosomes) could play physiological roles similar to that of stem cells. Bioactive proteins, lipids and bioactive substances, such as DNA, mRNA and non-coding RNA carried by exosomes may have the same functions as the therapeutic mechanisms of MSCs. In this review, we mainly summarize the origin and release, extraction and identification, biological functions and future prospect of MSC-exosomes. This review provides a comprehensive summary of MSC-exosomes, which would be helpful for further research in this field.

Key words exosomes; mesenchymal stem cells (MSCs); tissue repair; immunomodulation; nanocarriers

间充质干细胞(mesenchymal stem cell, MSC)作为一种成体干细胞,广泛存在于结缔组织和器官间质,具有多向分化潜能、自我复制能力、造血支持和免疫调控等特点。MSC目前已经被应用于造血系统疾病、抗移植排斥、器官缺血性损伤的修复和自身免疫性疾病的免疫调节治疗等临床试验中,在再生医学领域有着重要的作用。然而,干细胞治疗方法伴随的成瘤性与滞留性等生物安全问题,严重限制

收稿日期: 2017-12-08; 修回日期: 2018-03-12; 接受日期: 2018-03-26

国家自然科学基金项目(No. 81771271)资助

* 通讯作者 Tel: 024-96615-28111; E-mail: juanfeng@cmu.edu.cn
Received: December 8, 2017; Revised: March 12, 2018; Accepted: March 26, 2018

Supported by National Natural Science Foundation of China (No. 81771271)

* Corresponding author Tel: 024-96615-28111; E-mail: juanfeng@cmu.edu.cn

其广泛的临床应用,干细胞治疗也存在许多的争议和未知^[1]。以往的研究表明,MSC 通过迁移到损伤部位,定向分化为靶细胞发挥治疗作用。近年的研究发现,移植后的干细胞能够成功迁移,并定向分化修补缺损组织的比例十分有限,且移植后产生治疗效应的时间与其所需的漫长的迁移分化时间不符。目前的研究结果,更支持 MSC 通过旁分泌的机制来发挥作用的观点^[2]。干细胞可以产生携带活性的蛋白质、细胞因子和核酸类物质的外泌体(exosomes)^[3],影响周围和远隔细胞的生物学功能。外泌体的一些特性能够突破干细胞治疗的许多问题^[4,5],例如应用外泌体比直接移植或输注干细胞更加安全、快捷与高效,能更好地发挥干细胞的治疗潜能。因此,外泌体在组织损伤修复^[6]和免疫调节等方面的作用更加受关注。本文从 MSC-exosomes 如何产生、释放与发挥何种生物学功能,及其巨大的应用前景等几个方面,概述近年来相关的研究进展。

1 外泌体的生物学来源

外泌体最初被当作红细胞成熟过程中代谢所产生的无用物质^[7]。之后的研究表明,体内的大多数细胞,如内皮细胞^[8]、上皮细胞^[9]、神经细胞^[10]、免疫细胞^[11,12]、肥大细胞^[13]、血小板^[14]以及脂肪细胞^[15]等都能够释放外泌体。外泌体是直径介于 30~100 nm,密度为 1.10~1.18 g/mL 的脂质双层膜性微囊泡,可以通过电镜进行观察。最新的研究证实,外泌体的大小可以影响其作用方式,直径越小的外泌体越容易被靶细胞吸收,能够加快细胞间的物质和信息交流^[16]。

外泌体的产生是通过胞内体途径^[17],首先由细胞膜内陷形成胞内小泡,选择性接受部分胞浆形成早期内吞小体,进一步发育成晚期内吞小体,以向内出芽的方式形成多囊泡内体(multivesicular body)。若与胞内的溶酶体结合则内容物降解,否则继续向细胞膜转运并与之融合,将含有内含物的微囊泡释放到胞外,形成外泌体^[18,19]。多泡体形成的过程依赖于内体分选转运复合体(endosomal sorting complex required for transport, ESCRT)的作用^[20]。由 ESCRT 的 4 个复合物组分,并与多泡体生成相关衔接蛋白质结合,促进囊泡向内出芽。也有学者认为,外泌体释放与脂筏的内吞作用有直接的联系^[21,22]。

随着越来越多的外泌体相关研究的开展,其在疾病诊断和治疗等方面广阔的应用前景备受关注。

例如,组织特异性的外泌体可作为非侵入性的预后标志物,用于监测器官移植后的免疫排斥反应^[23]。与体内的正常细胞相比,肿瘤细胞^[24]能够分泌更大量的外泌体。这些外泌体与营造肿瘤细胞分化转移的微环境密切相关。基于肿瘤外泌体发展出来的新型液体活检技术——微流体外泌体芯片,可以用来检测癌症早期循环生物学标志物,有利于肿瘤个体化诊断和精准治疗^[25]。

目前,提取外泌体的方法有:蔗糖密度梯度离心法、差速离心法、一步式沉淀试剂盒法、过滤离心法、免疫磁珠分离法以及色谱法^[26]。但是,在所有已知的方法中,尚无制备迅速且操作步骤简便,提取外泌体的形态、纯度、产量和生物活性均符合后续实验要求的方法。外泌体的纯度可能会影响其生物学活性。外泌体样本中的残余物质会阻碍外泌体与靶细胞膜的接触和融合。只有将目前的提取方法进行整合,才能有效降低样本中的杂质^[27]。采用超速离心法获得的外泌体纯度较高,但是操作时间长,过程复杂,对仪器的质量要求高,一般的基层研究机构难以开展。商品化的沉淀试剂盒提取外泌体速度快,外泌体产量高,但是价格较为昂贵,试剂残留较多,有一定的细胞毒性,对后续的功能试验影响较大。最新研究表明,低 pH 的酸性环境有利于外泌体的稳定保存,并且能够提高外泌体的产量^[28]。将重悬于无菌 PBS 溶液中的外泌体,冻存于 -80℃ 的条件下,能够保存 1 年,而不改变其形态和生物学特性。在 -20℃ 条件下,可以保存 6 个月^[29]。

2 间充质干细胞外泌体的标志物和特异性内容物

外泌体由 2 大类物质组成:一类是位于细胞表面或内部的特异性标志物,其掌管胞间信号传递或是结构相关蛋白质;另一类是囊泡的内含物,可以分泌到细胞外进行物质的交换,调节自身或其他细胞功能。间充质干细胞-外泌体(MSC-exosomes)表达所有外泌体共同表达的相关标志物,包括细胞骨架蛋白质:微管蛋白和肌动蛋白,还有多囊泡胞内体生成相关蛋白质:ALG-2 相互作用蛋白 X(ALG-2-interacting protein X, Alix)、肿瘤易感基因 101 蛋白(tumor susceptibility gene 101, Tsg101)、分子伴侣热休克蛋白(heat shock protein, HSP) HSP70、HSP90、整合素和四跨膜蛋白质超家族 CD9、CD81、CD63 和 CD59 等^[30,31],以及多种脂蛋白、鞘磷脂、神经酰胺和磷脂酰丝氨酸。此外,MSC-exosomes 也能够表达

MSC 表面特异性的标志物,如 CD29、CD90^[32]、CD73^[33]和 CD44^[34]。这些表面分子能通过免疫印迹分析以及流式细胞仪进行鉴定。这些标志物的种类和数目随着 MSC 生理状态的变化发生着改变。值得注意的是,相关研究建议,不要在分离过程中使用牛血清白蛋白(bovine serum albumin, BSA),以避免细胞特异性胞外囊泡的蛋白质定量、物理性质和功能效应的结果不准确^[32]。

外泌体中含有丰富的 miRNA^[35]。有报道指出^[36],成人 MSC 中,含有 miR-191、miR-222、miR-21 和 let-7 a 等调节细胞增殖,miR-222、miR-21 和 let-7f 促进血管生成,miR-6087 能促进内皮的分化,miR-494 能够加速血管和肌肉的生成作用^[37],miR-181c 可以减轻烧伤导致的炎症损伤^[38],miR-16 能够通过下调肿瘤细胞中 VEGF(vascular endothelial growth factor, VEGF)的表达,抑制肿瘤的生长^[39]。研究表明,骨髓 MSC 来源的外泌体,包含人类 microRNA 总量的 8.84%^[40]。这些 miRNA 可能参与了 mRNA 合成、降解和运输等过程的调控^[33],是遗传信息的内源性调控者。相关研究报道,人骨髓 MSC 和脂肪 MSC 来源的外泌体中,包含大量 miRNA 和 tRNA,且二者包含 RNA 的种类和数目不完全相同。其中,骨髓 MSC-exosomes 中,含量最高的 5 种 miRNA 为 miR-143-3p、miR-10b-5p、miR-486-5p、miR-22-3p 和 miR-21-5p;脂肪 MSC-exosomes 中,含量最高的 5 种

miRNA 为 miR-486-5p、miR-10a-5p、miR-10b-5p、miR-191-5p 和 miR-222-3p,占全部 miRNA 含量的 43%~59%^[41]。此外,通过蛋白质组学检测发现,MSC-exosomes 中,还有白介素(interleukin, IL)-10、IL-6、IL-12、转化生长因子- β (transforming growth factor, TGF- β)、巨噬细胞集落刺激因子(macrophage colony-stimulating factor, M-CSF)、前列腺素 E2(prostaglandin E2, PGE2)等细胞因子和脑源性神经营养因子(brain derived neurotrophic factor, BDNF)、肝细胞生长因子(hepatocyte growth factor, HGF)、血管内皮生长因子(VEGF)、血小板衍生生长因子(platelet derived neurotrophic factor, PDGF)、成纤维细胞生长因子(fibroblast growth factor, FGF)等生长因子,在维持组织稳态和平衡中扮演着重要的角色^[42]。例如,经 TGF- β 与 γ 干扰素(interferon- γ , IFN- γ)组合处理后的 MSC-exosomes 中的 IFN- γ 、双加氧酶(dioxygenase, IDO)和 IL-10 含量显著增高,更有效地促进单核细胞向调节性 T 细胞(T regular cell, Treg cell)的转化^[43]。此外, MSC-exosomes 能够转运 14-3-3 ζ 蛋白调节 ATG16 L 促进自噬,预防顺铂诱导的急性肾衰竭^[44]。脂肪 MSC-exosomes 通过将携带的活性 STAT3 (signal transducer and activator of transcription 3)转移到巨噬细胞中,通过反式激活精氨酸酶-1(arginase-1, Arg-1)以诱导抗炎性 M2 表型^[45]。

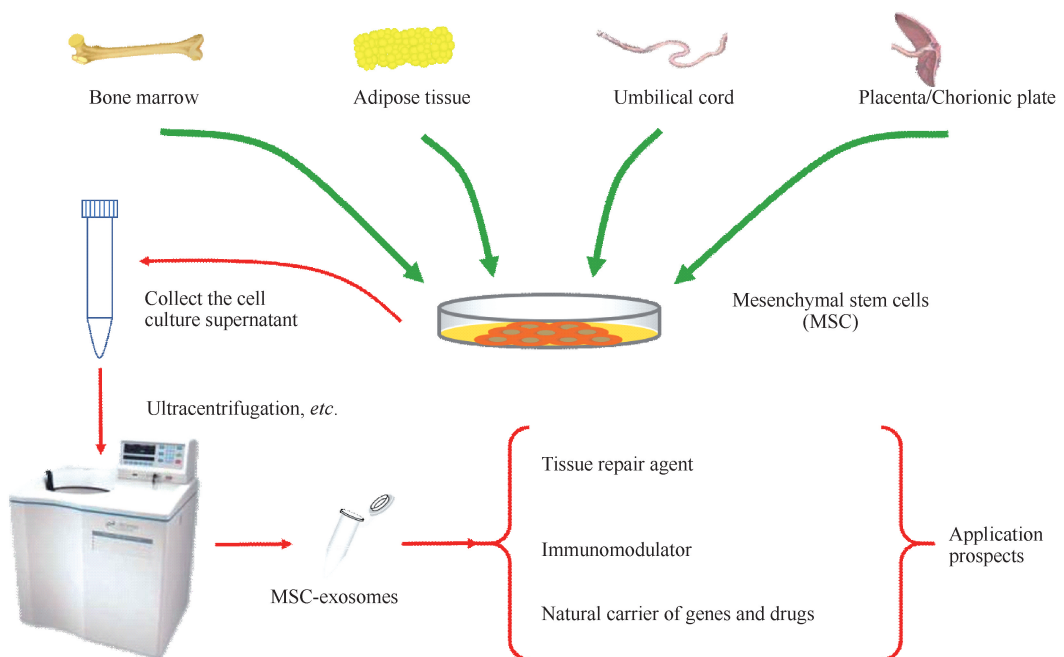


Fig. 1 The isolation process of MSC-exosomes and their application prospects

3 间充质干细胞外泌体的生物学功能

MSC-exosomes 由于来源细胞的不同,还可以分为更多的亚类。常见的有骨髓 MSC-exosomes、脂肪 MSC-exosomes、脐带 MSC-exosomes、胎盘 MSC-exosomes 和绒毛膜板 MSC-exosomes,其中骨髓 MSC-exosomes 在研究中最为常用,在未来有希望最早应用于临床;脂肪 MSC-exosomes 在多种 MSC 中较易获得,近年来也引起了很多研究者的关注;脐带、胎盘和绒毛膜板 MSC-exosomes 由于来源珍贵,目前研究数量还比较有限。MSC 虽然分为不同的亚类,但是它们分泌的外泌体都具有共同的特性,将在下文进行具体阐述。

3.1 改善缺血性损伤

相关的研究表明,MSC 分泌的外泌体通过携带 miRNA 发挥作用^[46],能够缓解肢体^[47]、心肌^[48]和肾^[13]的缺血性损伤,促进损伤组织成纤维细胞增殖、迁移和体外的血管形成^[49]。最近研究发现,转染 *GATA-4* 基因的 MSC 分泌的外泌体,对缺血坏死的心肌进行心肌内注射,比未转染前的外泌体具有更强的心肌保护作用,能够有效减小梗死面积,促进心肌功能恢复,可能与其富含具有抗凋亡作用的 miR-19a 有关^[50]。此外,外泌体还可以通过抑制 STAT3 信号通路,抑制缺氧诱导的 miRNA-17 超家族簇,增加抗增殖 miRNA-204 在肺内的表达,从而减轻缺氧引起的肺动脉高压^[51]。

最新研究表明,经一氧化氮刺激后的人胎盘和 MSC-exosomes,可通过携带促血管生成的 miRNA-126 和 VEGF,增强人脐静脉内皮细胞的血管生成能力,改善后肢缺血鼠类模型的肢体功能^[52]。MSC-exosomes 能够减少心肌缺血再灌注损伤小鼠的梗死面积。对 MSC-exosomes 进行质谱分析,筛选出 20S 蛋白酶体作为候选的功能蛋白质。质谱分析检测到 20S 蛋白酶体所包含的 7 条 α 链和 7 条 β 链,以及“免疫蛋白酶体”的 3 个 β 亚基^[34]。20S 蛋白酶体做为一种外泌体内的功能蛋白质,可能与其他成分协同作用,改善组织损伤。

3.2 神经保护和神经再生

德克萨斯健康科学中心利用成人 MSC-exosomes 制成的滴鼻喷雾给药,被大脑皮层运动区神经元及激活状态的小胶质细胞摄取,能够缓解神经元的炎症,防止认知和记忆功能障碍以及主管记忆功能的海马的异常神经发生^[53]。MSC-exosomes 对创伤性脑损伤大鼠的治疗研究中,外泌体处理组

的大鼠脑边缘区和齿状回的新生内皮细胞,以及新生的成熟及未成熟神经元数量均显著增加,神经炎症得到明显的减轻。水迷宫试验证实,经外泌体处理后,模型大鼠的脑功能也得到恢复^[54, 55]。胚胎干细胞和某些成体干细胞的外泌体的研究表明^[56],其可以调控体内组织细胞的生理状态和功能,并且在一定程度上避免由于细胞移植导致的异常分化或滞留成瘤。

将神经元和星形胶质细胞在表达丰富 miR-133b 的 MSC-exosomes 中培养发现,外泌体使神经细胞突起的数量增多,长度增加,具有促进神经生长的作用^[57]。在脑出血大鼠模型中进一步研究证实,miR-133b 修饰的 MSC-exosomes 能显著抑制脑出血后 RhoA (ras homolog gene family member A) 的表达,并激活 (ERK) 1/2/ CREB (extracellular regulated protein kinases (ERK) 1/2/cAMP-response element binding protein, ERK) 1/2/CREB 通路^[58],抑制脑梗死后神经细胞的凋亡,促进神经细胞的自我修复,可以作为神经退行性疾病潜在的治疗工具^[59]。而且研究表明,MSC-exosomes 的神经保护潜能是呈剂量和体外培养代数依赖的^[60]。培养代数越少效果越明显,较低剂量的外泌体通过抗凋亡、抗坏死和抗氧化等机制保护神经元,而较高剂量的外泌体被发现对神经元有害。除此之外,外泌体对视神经损伤的模型研究也取得了一定的进展,人骨髓 MSC 转染 siRNA 沉默 Argonaute-2 基因后,其分泌的外泌体促进视网膜神经节细胞的存活^[61],对视神经创伤性疾病以及青光眼等退行性眼病的治疗也有意义。

3.3 肝组织保护和肝细胞再生

在四氯化碳引发的急性肝损伤的小鼠模型中,MSC-exosomes 处理组小鼠肝组织损伤减弱,肝细胞增殖增加,增殖细胞核抗原 (proliferating cell nuclear antigen, PCNA) 和细胞周期蛋白 D1 (cyclin D1) 表达上调,通过激活增殖和再生反应,发挥对抗毒物诱导损伤的肝组织保护作用。在体外试中,MSC-exosomes 还通过上调 B-cell lymphoma-extra large (Bcl-xL) 蛋白,抑制对乙酰氨基酚 (acetaminophen, APAP) 和过氧化氢诱导的肝细胞凋亡^[62]。MSC-exosomes 减少肝表面纤维间隔,并使其质地柔软,减轻四氯化碳诱导的纤维化肝中的肝炎症和胶原沉积。并显著恢复体内血清天冬氨酸转氨酶 (aspartate transaminase, AST) 活性,降低 I 型和 III 型胶原蛋白, TGF- β 1 和磷酸化 SMAD 家族成员 2 (SMAD family member 2, Smad2) 表达,

从而抑制肝细胞的上皮间充质转化,保护肝细胞来改善四氯化碳诱导的肝纤维化^[63]。另一项研究表明,绒毛膜板 MSC-exosomes 中的 miRNA-125b,通过抑制 Hedgehog 信号通路的激活,减少肝纤维化,促进肝细胞的再生^[64]。

3.4 促进骨再生

同期的多项研究表明, MSC-exosomes 能够促进骨和软骨的再生^[65]。用荧光标记外泌体中的 Fas 蛋白,观察疾病小鼠 MSC 对外泌体的吸收情况。经检测吸收外泌体后, MSC 内 miR-29b 表达降低,甲基化酶活性上调,从而下调 *Notch* 基因的表达, MSC 的成骨分化能力显著增强,骨质疏松症状得到改善。另有对颅骨缺损的 SD 大鼠的研究表明,应用骨髓基质干细胞来源的胞外囊泡—EV(包含微泡和外泌体),通过其中的 miR-196 a 对成骨基因和成骨细胞分化产生正向调节作用,增强成骨细胞活性并促进颅骨再生^[66]。通过进一步的研究表明, MSC-exosomes 骨软骨缺损修复的特征是,增加细胞增殖和浸润,增强基质合成和调节再生免疫反应^[67]。外泌体治疗为骨折、骨质疏松等骨再生障碍疾病带来新的希望,通过刺激骨再生功能,促进骨骼生长,一方面避免生物材料的免疫原性导致的移植物抗宿主病,另一方面,避免干细胞治疗带来的肿瘤和细胞栓塞。预计未来几年内,能够研制出干细胞外泌体注射液,降低由老化或疾病带来的骨质疏松,甚至病理性骨折的风险。

3.5 免疫调节功能

3.5.1 影响巨噬细胞极化 LPS 预处理后的脐带 MSC,通过分泌转运 let-7b 的外泌体,缓解组织损伤引起的慢性炎症^[68]。并认为 let-7b/Toll like receptor 4 (TLR4) 通路可能对巨噬细胞极化和炎症消除有潜在的贡献,在控制 let-7b 的表达和调节巨噬细胞的可塑性方面发挥重要作用。

研究结果表明,经过 IL-1 β 预处理的 MSC 比未处理的原代 MSC 具有更强的免疫调节作用^[69]。经预处理的细胞在盲肠结扎和穿刺导致的败血症小鼠模型中能有效改善脓毒症的症状,与未处理组相比使存活率得到提高,进一步发现, IL-1 β 能够使 MSC 分泌的外泌体中有高水平的抗炎 miR-146a,外泌体被巨噬细胞吸收后发生 M2 极化,发挥抗炎和免疫调节作用。最新的研究报道,脂肪 MSC-exosomes 也可以诱导 M2 型的巨噬细胞,有助于调节免疫代谢稳态,为肥胖和糖尿病提供潜在的治疗方法^[45]。

3.5.2 影响 T 细胞分化 将人的脂肪 MSC 分泌的外泌体在与活化的 T 细胞体外共培养时,检测到 IFN- γ 的产生^[70],外泌体通过影响 T 细胞各亚群分布和增殖活性,发挥免疫调节作用。在移植物抗宿主反应的研究中, MSC-exosomes 能够诱导产生 M2 表型的单核细胞,从而极化激活 CD4⁺ T 细胞向 Tregs 转化,延迟排斥反应的出现^[71]。

3.5.3 对树突状细胞、B 细胞和自然杀伤细胞的影响 在最近的基础研究报道, MSC 来源的胞外囊泡可以使树突状细胞 (dendritic cell, DC) 获得不成熟的表型,并增加 IL-10 分泌,有助于抑制炎症 T 细胞对胰岛抗原的反应^[72, 73]。通过比较 MSC 来源的胞外囊泡对普通外周血单个核细胞和纯化的 T、B 细胞和自然杀伤 (natural killer, NK) 细胞的免疫调节作用,证明胞外囊泡介导的免疫抑制程度与免疫效应细胞对其的摄取有直接的关系。对外周血单个核细胞来说大多数的囊泡由单核细胞内化,而不是 T 细胞和 B 细胞。此外, MSC 来源的胞外囊泡未见明显抑制 T 细胞的增殖,而下调 NK 细胞和 B 细胞的增殖^[74]。

3.5.4 影响循环免疫复合物的产生 骨髓 MSC-exosomes 通过表达程序性死亡配体 1 (programmed death-ligand 1, PD-L1)、乳糖凝集素和 TGF- β 抑制自身免疫细胞介导的组织损伤^[75]。卒中诱导的免疫抑制通常将导致更加严重的神经损伤。有研究表明, MSC-exosomes 在促进卒中后神经再生的同时,参与调节缺血后的免疫应答减轻缺血后的免疫抑制^[76]。

3.5.5 减轻炎症和抗病毒感染 MSC 分泌的胞外囊泡中含有 1/3 的外泌体和 2/3 的微泡,二者共同作用于猪肾动脉狭窄模型,能够显著减轻肾的炎症^[77]。研究表明,胞外囊泡中含有的 IL-10 能够减轻肾缺血和纤维化。野生型 MSC-exosomes 高表达 miR-223,下调 Sema3A 和 Stat3,对脓毒症小鼠的心肌具有保护作用^[78];相反,敲除 miR-223 的 MSC,加重脓毒症导致的损伤。人脐带 MSC-exosomes 高表达 miR-181c,下调 TLR4 通路,缓解烧伤大鼠的炎症反应,降低血浆细胞因子 TNF- α 、IL-1 β 的含量,提高 IL-10 水平^[38]。此外, MSC-exosomes 能治疗实验性坏死性小肠结肠炎 (NEC)^[79]。人脐带 MSC-exosomes 具有预防丙型肝炎病毒感染的功能^[80],且当其与干扰素或其他 HCV 治疗药物联用时,能够产生抗病毒的作用,未来可能成为新型的丙肝疫苗,为丙型肝炎的治疗提供新的前景。

3.6 改变肿瘤微环境

研究表明, MSC-exosomes 通过介导细胞间信息的交流, 修饰细胞的表型和功能, 在与肿瘤细胞相互作用的过程中, 通过内化 exosomes 改变细胞功能, 重组肿瘤微环境, 使肿瘤细胞获得新的特性^[81]。有报道显示, MSC-exosomes 能够拮抗 5-氟尿嘧啶 (5-fluorouracil, 5-Fu) 诱导的细胞凋亡, 增加多药耐药相关蛋白 (multidrug resistance-related proteins, MRP) 和肺耐药蛋白 (lung resistance protein, LRP) 的表达, 诱导胃癌细胞对 5-氟尿嘧啶产生耐药性^[82]。

4 间充质干细胞外泌体的应用前景和局限性

4.1 MSC-exosomes 作为组织修复因子和免疫调节剂发挥治疗作用

MSC-exosomes 在机体内发挥与其来源细胞相似的功能, 其在组织修复和免疫调节方面的作用将是未来研究的热点。外泌体由于其纳米尺度的大小可以自由通过血脑屏障, 通过滴鼻的方法直接作用于颅内的病灶, 通过简单无创的方式给药, 避免开颅手术的风险, 具有良好的临床应用价值。外泌体能在血液中稳定存在, 不被补体裂解; 并且能从细胞培养上清中连续获得; 易于被抗原提呈细胞摄取, 发挥免疫调节功能。较之 MSC 的直接移植或输注, 外泌体的应用更安全、更高效, 能够更好地发挥干细胞的免疫调节潜能和临床治疗价值, 是减轻自身免疫细胞介导组织损伤、缓解自身免疫性疾病进展的新途径。

4.2 MSC-exosomes 是药物和基因的天然理想载体

外泌体中检测到蛋白质和 RNA 的存在, 提示它可以作为这类物质的天然载体。同时, 它能够避免被巨噬细胞吞噬和降解, 作为细胞的自然产物在体内长时间循环; 并能自由通过血脑屏障在内的各种生物屏障, 提示可以利用外泌体达到靶向治疗疾病的目的。未来能使用技术操控治疗用外泌体直径的大小, 产生最适用于药物递送的外泌体, 提高给药效率。外泌体可作为特定药物的纳米载体, 保护这些生物活性物质在体液中不被降解或稀释的同时, 通过血液或组织液循环对其进行靶向的远距离输送, 并与靶细胞进行高效率结合发挥效应。

在选择生产用于药物递送的外泌体的细胞类型时, 每个细胞的外泌体产量是影响生产成本的首要考虑因素。在比较多种产生外泌体的细胞类型中,

MSC 为外泌体最高产的一种细胞。因此, MSC 是大规模生产用于药物递送的外泌体的理想候选者^[83]。目前在某些研究中, MSC-exosomes 已被用作肿瘤治疗和再生医学的药物递送载体, 如利用电穿孔的方法将药物直接转入外泌体, 实现对药物的运载^[84]。体外包装紫杉醇的骨髓 MSC-exosomes 对人胰腺癌细胞显示出强大的抗肿瘤作用^[85]。

通过外泌体搭载编码兴趣蛋白质的基因或 RNA, 采用膜融合的方式将其携带的目的基因或 RNA 释放到靶细胞内, 发挥相应的生物学功能。由于避免了内体和溶酶体途径, 外泌体传递 siRNA 具有更高的转染效率。已有研究表明, 经过 miR-122 修饰的脂肪 MSC 分泌的外泌体, 可以作为 miR-122 天然的载体, 高表达 miR-122 的 HCC 细胞对化疗药物索拉菲尼的敏感性增强, 为肝细胞癌的治疗提供新的策略^[86]。

目前, 最新的研究通过改造外泌体, 使其与脂质体发生膜融合, 产生一种新型纳米载体。采用冻融技术将表面带有功能性脂质的脂质体与外泌体进行融合, 用来改造受体细胞的细胞膜脂质成分, 使得改造后的膜杂交外泌体成为更具有价值的药物递送系统^[87]。

5 问题与展望

然而, 目前关于 MSC-exosomes 的临床应用仍存在以下几个限制因素: (1) 目前普遍应用的提取外泌体的方法主要是针对外泌体内生物活性物质的研究, 一旦将其应用于临床治疗, 寻找有效提高外泌体纯度和产量的方法亟待解决; (2) 对于干细胞源性外泌体的促进血管生成、抑制细胞凋亡、调节免疫反应和减少炎症浸润的具体机制尚未完全阐明, 仍需体外和动物实验进一步证实探究; (3) 对于携带外源目的 miRNA 和 siRNA 的外泌体应用于人体内的远期安全性仍需进一步评估。

综上所述, MSC-exosomes 比干细胞来源更广、提取更方便, 在自身免疫性疾病和缺血性组织损伤修复方面起到与干细胞相似的免疫调节和保护作用。且外泌体在体内稳定存在半衰期长, 可作为搭载药物和外源核酸类物质的天然载体, 比干细胞治疗更加安全高效, 是拥有巨大潜力的新型的无细胞生物治疗途径之一。

参考文献 (References)

[1] Atoui R, Chiu RC. Concise review: immunomodulatory

- properties of mesenchymal stem cells in cellular transplantation: update, controversies, and unknowns [J]. *Stem Cells Transl Med*, 2012, **1**(3): 200-205
- [2] Lankford KL, Arroyo EJ, Nazimek K, *et al.* Intravenously delivered mesenchymal stem cell-derived exosomes target M2-type macrophages in the injured spinal cord [J]. *PLoS One*, 2018, **13**(1): e0190358
- [3] Nawaz M, Fatima F, Vallabhaneni KC, *et al.* Extracellular vesicles: evolving factors in stem cell biology [J]. *Stem Cells Int*, 2016, **2016**: 1073140
- [4] Xie L, Mao M, Zhou L, *et al.* Spheroid mesenchymal stem cells and mesenchymal stem cell-derived microvesicles: two potential therapeutic strategies [J]. *Stem Cells Dev*, 2016, **25**(3): 203-213
- [5] Rani S, Ryan AE, Griffin MD, *et al.* Mesenchymal stem cell-derived extracellular vesicles: toward cell-free therapeutic applications [J]. *Mol Ther*, 2015, **23**(5): 812-823
- [6] Lopez-Verrilli MA, Caviades A, Cabrera A, *et al.* Mesenchymal stem cell-derived exosomes from different sources selectively promote neuritic outgrowth [J]. *Neuroscience*, 2016, **320**: 129-139
- [7] Johnstone RM, Adam M, Hammond JR, *et al.* Vesicle formation during reticulocyte maturation. Association of plasma membrane activities with released vesicles (exosomes) [J]. *J Biol Chem*, 1987, **262**(19): 9412-9420
- [8] Xiao B, Chai Y, Lv S, *et al.* Endothelial cell-derived exosomes protect SH-SY5Y nerve cells against ischemia/ reperfusion injury [J]. *Int J Mol Med*, 2017, **40**(4): 1201-1209
- [9] van Niel G, Raposo G, Candalh C, *et al.* Intestinal epithelial cells secrete exosome-like vesicles [J]. *Gastroenterology*, 2001, **121**(2): 337-349
- [10] Glebov K, Lochner M, Jabs R, *et al.* Serotonin stimulates secretion of exosomes from microglia cells [J]. *Glia*, 2015, **63**(4): 626-634
- [11] Liu H, Gao W, Yuan J, *et al.* Exosomes derived from dendritic cells improve cardiac function via activation of CD4 (+) T lymphocytes after myocardial infarction [J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2016, **91**: 123-133
- [12] Meckes DG Jr, Gunawardena HP, Dekroon RM, *et al.* Modulation of B-cell exosome proteins by gamma herpesvirus infection [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2013, **110**(31): E2925-2933
- [13] Xiao H, Lasser C, Shelke GV, *et al.* Mast cell exosomes promote lung adenocarcinoma cell proliferation - role of KIT-stem cell factor signaling [J]. *Cell Commun Signal*, 2014, **12**: 64
- [14] Aatonen MT, Ohman T, Nyman TA, *et al.* Isolation and characterization of platelet-derived extracellular vesicles [J]. *J Extracell Vesicles*, 2014, **3**. doi: 10.3402/jev.v3.24692
- [15] Huber HJ, Holvoet P. Exosomes: emerging roles in communication between blood cells and vascular tissues during atherosclerosis [J]. *Curr Opin Lipidol*, 2015, **26**(5): 412-419
- [16] Caponnetto F, Manini I, Skrap M, *et al.* Size-dependent cellular uptake of exosomes [J]. *Nanomedicine*, 2017, **13**(3): 1011-1020
- [17] Kowal J, Tkach M, Thery C. Biogenesis and secretion of exosomes [J]. *Curr Opin Cell Biol*, 2014, **29**: 116-125
- [18] Simons M, Raposo G. Exosomes--vesicular carriers for intercellular communication [J]. *Curr Opin Cell Biol*, 2009, **21**(4): 575-581
- [19] Vlassov AV, Magdaleno S, Setterquist R, *et al.* Exosomes: current knowledge of their composition, biological functions, and diagnostic and therapeutic potentials [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2012, **1820**(7): 940-948
- [20] Ludwig AK, Giebel B. Exosomes: small vesicles participating in intercellular communication [J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2012, **44**(1): 11-15
- [21] Tan SS, Yin Y, Lee T, *et al.* Therapeutic MSC exosomes are derived from lipid raft microdomains in the plasma membrane [J]. *J Extracell Vesicles*, 2013, **2**. doi: 10.3402/jev.v2i0.22614
- [22] Villarroya-Beltri C, Baixauli F, Gutierrez-Vazquez C, *et al.* Sorting it out: regulation of exosome loading [J]. *Semin Cancer Biol*, 2014, **28**: 3-13
- [23] Vallabhajosyula P, Korutla L, Habertheuer A, *et al.* Tissue-specific exosome biomarkers for noninvasively monitoring immunologic rejection of transplanted tissue [J]. *J Clin Invest*, 2017, **127**(4): 1375-1391
- [24] Zhang W, Peng P, Kuang Y, *et al.* Characterization of exosomes derived from ovarian cancer cells and normal ovarian epithelial cells by nanoparticle tracking analysis [J]. *Tumour Biol*, 2016, **37**(3): 4213-4221
- [25] He M, Zeng Y. Microfluidic exosome analysis toward liquid biopsy for cancer [J]. *J Lab Autom*, 2016, **21**(4): 599-608
- [26] Lobb RJ, Becker M, Wen SW, *et al.* Optimized exosome isolation protocol for cell culture supernatant and human plasma [J]. *J Extracell Vesicles*, 2015, **4**: 27031
- [27] Paolini L, Zendrini A, Di Noto G, *et al.* Residual matrix from different separation techniques impacts exosome biological activity [J]. *Sci Rep*, 2016, **6**: 23550
- [28] Ban JJ, Lee M, Im W, *et al.* Low pH increases the yield of exosome isolation [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2015, **461**(1): 76-79
- [29] Konala VB, Mamidi MK, Bhonde R, *et al.* The current landscape of the mesenchymal stromal cell secretome: A new paradigm for cell-free regeneration [J]. *Cytotherapy*, 2016, **18**(1): 13-24
- [30] Wubbolts R, Leckie RS, Veenhuizen PT, *et al.* Proteomic and biochemical analyses of human B cell-derived exosomes. Potential implications for their function and multivesicular body formation [J]. *J Biol Chem*, 2003, **278**(13): 10963-10972
- [31] de Gassart A, Geminard C, Fevrier B, *et al.* Lipid raft-associated protein sorting in exosomes [J]. *Blood*, 2003, **102**(13): 4336-4344
- [32] Stolk M, Seifert M. Protein contaminations impact quantification and functional analysis of extracellular vesicle preparations from mesenchymal stromal cells [J]. *J Stem Cells Regen Med*, 2015, **11**(2): 44-47
- [33] Yu B, Zhang X, Li X. Exosomes derived from mesenchymal stem cells [J]. *Int J Mol Sci*, 2014, **15**(3): 4142-4157
- [34] Lai RC, Tan SS, Teh BJ, *et al.* Proteolytic potential of the MSC exosome proteome: implications for an exosome-mediated delivery of therapeutic protease [J]. *Int J Proteomics*, 2012, **2012**: 971907
- [35] Squadrito ML, Baer C, Burdet F, *et al.* Endogenous RNAs modulate microRNA sorting to exosomes and transfer to acceptor cells [J]. *Cell Rep*, 2014, **8**(5): 1432-1446
- [36] Merino-Gonzalez C, Zuniga FA, Escudero C, *et al.* Mesenchymal stem cell-derived extracellular vesicles promote angiogenesis: potential clinical application [J]. *Front Physiol*, 2016, **7**: 24
- [37] Nakamura Y, Miyaki S, Ishitobi H, *et al.* Mesenchymal-stem-cell-derived exosomes accelerate skeletal muscle regeneration [J]. *FEBS Lett*, 2015, **589**(11): 1257-1265
- [38] 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
- [39] Lee JK, Park SR, Jung BK, *et al.* Exosomes derived from mesenchymal stem cells suppress angiogenesis by down-regulating VEGF expression in breast cancer cells [J]. *PLoS One*, 2013, **8**(12): e84256
- [40] Xu JF, Yang GH, Pan XH, *et al.* Altered microRNA expression profile in exosomes during osteogenic differentiation of human bone marrow-derived mesenchymal stem cells [J]. *PLoS One*, 2014, **9**(12): e114627
- [41] Baglio SR, Rooijers K, Koppers-Lalic D, *et al.* Human bone marrow- and adipose-mesenchymal stem cells secrete exosomes enriched in distinctive miRNA and tRNA species [J]. *Stem Cell*

- Res Ther, 2015, **6**: 127
- [42] Kim HS, Choi DY, Yun SJ, *et al.* Proteomic analysis of microvesicles derived from human mesenchymal stem cells[J]. J Proteome Res, 2012, **11**(2): 839-849
- [43] Zhang Q, Fu L, Liang Y, *et al.* Exosomes originating from MSCs stimulated with TGF-beta and IFN-gamma promote Treg differentiation[J]. J Cell Physiol, 2018. Jan 16. doi: 10.1002/jcp.26436
- [44] Jia H, Liu W, Zhang B, *et al.* HucMSC exosomes-delivered 14-3-3zeta enhanced autophagy via modulation of ATG16L in preventing cisplatin-induced acute kidney injury [J]. Am J Transl Res, 2018, **10**(1): 101-113
- [45] Zhao H, Shang Q, Pan Z, *et al.* Exosomes from adipose-derived stem cells attenuate adipose inflammation and obesity through polarizing M2 macrophages and beiging in white adipose tissue [J]. Diabetes, 2018, **67**(2): 235-247
- [46] Xin H, Li Y, Chopp M. Exosomes/miRNAs as mediating cell-based therapy of stroke[J]. Front Cell Neurosci, 2014, **8**: 377
- [47] Hu GW, Li Q, Niu X, *et al.* Exosomes secreted by human-induced pluripotent stem cell-derived mesenchymal stem cells attenuate limb ischemia by promoting angiogenesis in mice[J]. Stem Cell Res Ther, 2015, **6**: 10
- [48] Bian S, Zhang L, Duan L, *et al.* Extracellular vesicles derived from human bone marrow mesenchymal stem cells promote angiogenesis in a rat myocardial infarction model[J]. J Mol Med (Berl), 2014, **92**(4): 387-397
- [49] Shabbir A, Cox A, Rodriguez-Menocal L, *et al.* Mesenchymal stem cell exosomes induce proliferation and migration of normal and chronic wound fibroblasts, and enhance angiogenesis in vitro [J]. Stem Cells Dev, 2015, **24**(14): 1635-1647
- [50] Yu B, Kim HW, Gong M, *et al.* Exosomes secreted from GATA-4 overexpressing mesenchymal stem cells serve as a reservoir of anti-apoptotic microRNAs for cardioprotection[J]. Int J Cardiol, 2015, **182**: 349-360
- [51] Lee C, Mitsialis SA, Aslam M, *et al.* Exosomes mediate the cytoprotective action of mesenchymal stromal cells on hypoxia-induced pulmonary hypertension [J]. Circulation, 2012, **126**(22): 2601-2611
- [52] Du W, Zhang K, Zhang S, *et al.* Enhanced proangiogenic potential of mesenchymal stem cell-derived exosomes stimulated by a nitric oxide releasing polymer [J]. Biomaterials, 2017, **133**: 70-81
- [53] Long Q, Upadhyay D, Hattiangady B, *et al.* Intranasal MSC-derived A1-exosomes ease inflammation, and prevent abnormal neurogenesis and memory dysfunction after status epilepticus[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2017, **114**(17): E3536-E3545
- [54] Zhang Y, Chopp M, Meng Y, *et al.* Effect of exosomes derived from multipotent mesenchymal stromal cells on functional recovery and neurovascular plasticity in rats after traumatic brain injury[J]. J Neurosurg, 2015, **122**(4): 856-867
- [55] Kim DK, Nishida H, An SY, *et al.* Chromatographically isolated CD63 + CD81 + extracellular vesicles from mesenchymal stromal cells rescue cognitive impairments after TBI[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2016, **113**(1): 170-175
- [56] Lavoie JR, Rosu-Myles M. Uncovering the secreted of mesenchymal stem cells [J]. Biochimie, 2013, **95**(12): 2212-2221
- [57] Xin H, Li Y, Buller B, *et al.* Exosome-mediated transfer of miR-133b from multipotent mesenchymal stromal cells to neural cells contributes to neurite outgrowth[J]. Stem Cells, 2012, **30**(7): 1556-1564
- [58] Shen H, Yao X, Li H, *et al.* Role of exosomes derived from miR-133b modified MSCs in an experimental rat model of intracerebral hemorrhage[J]. J Mol Neurosci, 2018, **64**(3): 421-430
- [59] Jarmalaviciute A, Pivoriunas A. Exosomes as a potential novel therapeutic tools against neurodegenerative diseases [J]. Pharmacol Res, 2016, **113**(Pt B): 816-822
- [60] Venugopal C, Shamir C, Senthilkumar S, *et al.* Dosage and passage dependent neuroprotective effects of exosomes derived from rat bone marrow mesenchymal stem cells; an in vitro analysis[J]. Curr Gene Ther, 2017, **17**(5): 379-390
- [61] Mead B, Tomarev S. Bone marrow-derived mesenchymal stem cells-derived exosomes promote survival of retinal ganglion cells through miRNA-dependent mechanisms [J]. Stem Cells Transl Med, 2017, **6**(4): 1273-1285
- [62] Tan CY, Lai RC, Wong W, *et al.* Mesenchymal stem cell-derived exosomes promote hepatic regeneration in drug-induced liver injury models[J]. Stem Cell Res Ther, 2014, **5**(3): 76
- [63] Li T, Yan Y, Wang B, *et al.* Exosomes derived from human umbilical cord mesenchymal stem cells alleviate liver fibrosis[J]. Stem Cells Dev, 2013, **22**(6): 845-854
- [64] Hyun J, Wang S, Kim J, *et al.* MicroRNA125b-mediated Hedgehog signaling influences liver regeneration by chorionic plate-derived mesenchymal stem cells [J]. Sci Rep, 2015, **5**: 14135
- [65] Zhang S, Chu WC, Lai RC, *et al.* Exosomes derived from human embryonic mesenchymal stem cells promote osteochondral regeneration[J]. Osteoarthritis Cartilage, 2016, **24**(12): 2135-2140
- [66] Qin Y, Wang L, Gao Z, *et al.* Bone marrow stromal/stem cell-derived extracellular vesicles regulate osteoblast activity and differentiation in vitro and promote bone regeneration in vivo[J]. Sci Rep, 2016, **6**: 21961
- [67] Zhang S, Chuah SJ, Lai RC, *et al.* MSC exosomes mediate cartilage repair by enhancing proliferation, attenuating apoptosis and modulating immune reactivity[J]. Biomaterials, 2018, **156**: 16-27
- [68] Ti D, Hao H, Tong C, *et al.* LPS-preconditioned mesenchymal stromal cells modify macrophage polarization for resolution of chronic inflammation via exosome-shuttled let-7b [J]. J Transl Med, 2015, **13**: 308
- [69] Song Y, Dou H, Li X, *et al.* Exosomal miR-146a contributes to the enhanced therapeutic efficacy of interleukin-1beta-primed mesenchymal stem cells against sepsis[J]. Stem Cells, 2017, **35**(5): 1208-1221
- [70] Blazquez R, Sanchez-Margallo FM, de la Rosa O, *et al.* Immunomodulatory potential of human adipose mesenchymal stem cells derived exosomes on in vitro stimulated T cells[J]. Front Immunol, 2014, **5**: 556
- [71] Zhang B, Yin Y, Lai RC, *et al.* Mesenchymal stem cells secrete immunologically active exosomes[J]. Stem Cells Dev, 2014, **23**(11): 1233-1244
- [72] Favaro E, Carpanetto A, Lamorte S, *et al.* Human mesenchymal stem cell-derived microvesicles modulate T cell response to islet antigen glutamic acid decarboxylase in patients with type 1 diabetes[J]. Diabetologia, 2014, **57**(8): 1664-1673
- [73] Favaro E, Carpanetto A, Caorsi C, *et al.* Human mesenchymal stem cells and derived extracellular vesicles induce regulatory dendritic cells in type 1 diabetic patients [J]. Diabetologia, 2016, **59**(2): 325-333
- [74] Di Trapani M, Bassi G, Midolo M, *et al.* Differential and transferable modulatory effects of mesenchymal stromal cell-derived extracellular vesicles on T, B and NK cell functions[J]. Sci Rep, 2016, **6**: 24120
- [75] Mokarizadeh A, Delirez N, Morshedi A, *et al.* Microvesicles derived from mesenchymal stem cells; potent organelles for induction of tolerogenic signaling[J]. Immunol Lett, 2012, **147**(1-2): 47-54
- [76] Doepfner TR, Herz J, Gorgens A, *et al.* Extracellular vesicles improve post-stroke neuroregeneration and prevent postischemic immunosuppression[J]. Stem Cells Transl Med, 2015, **4**(10): 1131-1143
- [77] Eirin A, Zhu XY, Puranik AS, *et al.* Mesenchymal stem cell-derived extracellular vesicles attenuate kidney inflammation[J]. Kidney Int, 2017, **92**(1): 114-124
- [78] Wang X, Gu H, Qin D, *et al.* Exosomal miR-223 contributes to mesenchymal stem cell-elicited cardioprotection in polymicrobial

- sepsis[J]. *Sci Rep*, 2015, **5**: 13721
- [79] Rager TM, Olson JK, Zhou Y, *et al.* Exosomes secreted from bone marrow-derived mesenchymal stem cells protect the intestines from experimental necrotizing enterocolitis [J]. *J Pediatr Surg*, 2016, **51**(6): 942-947
- [80] Qian X, Xu C, Fang S, *et al.* Exosomal microRNAs derived from umbilical mesenchymal stem cells inhibit hepatitis C virus infection[J]. *Stem Cells Transl Med*, 2016, **5**(9): 1190-1203
- [81] Yang Y, Bucan V, Baehre H, *et al.* Acquisition of new tumor cell properties by MSC-derived exosomes[J]. *Int J Oncol*, 2015, **47**(1): 244-252
- [82] Ji R, Zhang B, Zhang X, *et al.* Exosomes derived from human mesenchymal stem cells confer drug resistance in gastric cancer [J]. *Cell Cycle*, 2015, **14**(15): 2473-2483
- [83] Yeo RW, Lai RC, Zhang B, *et al.* Mesenchymal stem cell: an efficient mass producer of exosomes for drug delivery[J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2013, **65**(3): 336-341
- [84] Lai RC, Yeo RW, Tan KH, *et al.* Exosomes for drug delivery - a novel application for the mesenchymal stem cell[J]. *Biotechnol Adv*, 2013, **31**(5): 543-551
- [85] Pascucci L, Cocce V, Bonomi A, *et al.* Paclitaxel is incorporated by mesenchymal stromal cells and released in exosomes that inhibit in vitro tumor growth: a new approach for drug delivery[J]. *J Control Release*, 2014, **192**: 262-270
- [86] Lou G, Song X, Yang F, *et al.* Exosomes derived from miR-122-modified adipose tissue-derived MSCs increase chemosensitivity of hepatocellular carcinoma[J]. *J Hematol Oncol*, 2015, **8**: 122
- [87] Sato YT, Umezaki K, Sawada S, *et al.* Engineering hybrid exosomes by membrane fusion with liposomes [J]. *Sci Rep*, 2016, **6**: 21933