

本文引用:郭瑞敏,曹毓琳,程世翔,等. 间充质干细胞源性外泌体在呼吸系统疾病中的应用与机制研究进展 [J]. 新乡医学院学报, 2021, 38(11): 1084-1089, 1094. DOI: 10.7683/xyxyxb.2021.11.017.

【综述】

间充质干细胞源性外泌体在呼吸系统疾病中的应用与机制研究进展

郭瑞敏^{1,2}, 曹毓琳², 程世翔³, 连杰¹, 刘彦礼¹, 林俊堂¹

(1. 新乡医学院干细胞与生物治疗技术研究中心, 河南 新乡 453003; 2. 北京臻溪谷医学研究中心, 北京 100034; 3. 武警部队脑创伤与神经疾病研究所/天津市神经创伤修复重点实验室, 天津 300052)

摘要: 外泌体是细胞分泌的一种脂质双分子层结构的纳米级细胞外囊泡, 携带大量的母体细胞相关的生物活性物质, 作为细胞间通讯的重要载体参与和调控机体的多种病理及生理过程。目前, 众多研究数据表明, 间充质干细胞在治疗呼吸系统疾病中前景广阔, 所以相较于其他细胞, 间充质干细胞来源的外泌体更具有转化优势。本文主要针对间充质干细胞源性外泌体在呼吸系统疾病方面的治疗作用及其相关机制进行综述, 以期对后续研发和临床转化工作起到指导和启发作用。

关键词: 间充质干细胞; 细胞外囊泡; 外泌体; 呼吸系统疾病

中图分类号: R56 **文献标志码:** A **文章编号:** 1004-7239(2021)11-1084-07

细胞外囊泡是一种由真核细胞在正常或病理条件下释放至细胞外、含有脂质双分子层结构、与细胞具有相同拓扑结构的胞外颗粒, 其大小从约 30 nm 至数微米不等^[1]。细胞外囊泡携带有大量的来自母体细胞的分子物质, 负责细胞间信号传递及物质代谢过程, 其内容物主要包括各种蛋白质、氨基酸、脂质、核酸及代谢物^[2-4]。依据细胞外囊泡直径大小可分为 3 类, 分别是凋亡小体(500 nm 至 4 μm)、微囊泡(100 nm 至 1 μm)和外泌体(30 ~ 100 nm)^[5-6]。

外泌体包含一系列膜相关的高阶寡聚蛋白复合物, 表现出明显的分子异质性, 由内容物微粒内陷或向内出芽形成多泡体(multivesicular body, MVB), 随后 MVB 外膜与细胞膜融合而产生^[7]。外泌体生物发生是一种蛋白质、脂质、核酸等的调控机制, 被胞体释放的外泌体具有多种活性功效, 是促进细胞间通讯的重要介质, 不需要细胞与细胞直接接触。在各种疾病中, 外泌体也成为了解细胞或组织状态变化的窗口, 通过检测其在生物液体中的多种组分为疾病诊断提供依据^[8]。上述机制在人类健康和疾病的许多方面发挥重要作用, 包括发育、免疫、组织稳态、癌症和神经退行性疾病等^[9]。同时, 一些

创新性研究揭示了外泌体作为纳米载体的优势, 与合成的纳米颗粒相比, 外泌体具有毒性低、无免疫原性和渗透性好等优势, 所以外泌体具有可以穿透天然屏障(如血脑屏障等)和逃脱免疫系统降解或清除的能力。总而言之, 外泌体天然的生物相容性使其成为临床理想的天然纳米载体^[10]。基于这些特性, 外泌体逐渐被开发为多种疾病模型的治疗药物。

使用间充质干细胞(mesenchymal stem cell, MSC)治疗呼吸系统疾病具有广阔的前景, 然而, 对 MSC 带来的医源性肿瘤形成风险的担忧仍然存在^[11]。越来越多的证据表明, MSC 来源的条件培养基和 MSC 释放的细胞外囊泡在新型无细胞治疗领域是极具吸引力的替代方案^[12-15]。研究显示, MSC 主要通过其分泌产物外泌体发挥作用^[16], 间充质干细胞外泌体(mesenchymal stem cell exosome, MSC-Exo)的功能是 MSC 作为组织基质支持细胞发挥生物学作用的延伸, 同其母体细胞一样, MSC-Exo 有助于维持组织稳态, 以获得最佳的组织功能^[17]。与 MSC 功能类似, MSC-Exo 在免疫调节和炎症反应方面的作用也备受关注。研究显示, MSC-Exo 可抑制 CD4⁺、CD8⁺ T 细胞和自然杀伤细胞的增殖和分化^[18], 抑制 T 细胞表达白细胞介素(interleukin, IL)-17, 并诱导调节性 T 细胞表达 IL-10, 这些细胞因子均与炎症反应有关; MSC-Exo 通过释放转化生长因子(transforming growth factor, TGF)等分子而辅助抑制 CD4⁺ 和 CD8⁺ T 细胞的分化, 从而预防体内炎症反应^[19]; MSC-Exo 还可将巨噬细胞从 M1 表型转化到 M2 表型, 抑制其促炎状态^[18]; MSC-Exo 也可抑制促炎因子如转化生长因子-α(transforming

DOI: 10.7683/xyxyxb.2021.11.017

收稿日期: 2021-09-12

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(编号: 81771226, U1804186); 河南省新型冠状病毒防控应急科技攻关项目(编号: 201100311200); 河南省自然科学基金杰出青年基金项目(编号: 202300410307); 新乡市新型冠状病毒防控应急科技攻关项目(编号: 20GG001)。

作者简介: 郭瑞敏(1989-), 女, 内蒙古人, 硕士, 助理研究员, 研究方向: 干细胞及其衍生物产品的技术开发和应用。
通信作者: 林俊堂(1976-), 男, 河南濮阳人, 博士, 教授, 研究方向: 干细胞与神经发育再生; E-mail: linjun@126.com。

growth factor- α , TGF- α)、 γ 干扰素 (interferon- γ , IFN- γ)、IL-6、IL-17 和 IL-1 的释放^[20], 促进抗炎因子 IL-4、IL-10 和 TGF- β 的释放^[21]。值得注意的是, MSC-Exo 被大量用于多种疾病模型的临床前研究, 如骨骼肌再生^[22]、免疫治疗和皮肤组织再生、骨关节炎和骨折^[23-25]、肝脏疾病^[26]、自身免疫疾病和神经系统退行性紊乱疾病^[27-28]、2 型糖尿病^[29]、肿瘤或癌症^[30]、牙龈修复和牙周组织再生^[31-32]、心脏病^[33-34] 及眼科疾病^[10] 等, 同时, 对呼吸系统疾病也具有广阔的治疗前景。故本文就 MSC-Exo 治疗呼吸系统疾病及相关机制进行阐述, 以期对临床药物开发起到指导作用。

1 MSC-Exo 对哮喘的作用

哮喘是一种复杂的慢性炎症性疾病, 通常始于儿童时期^[35], 其特征是呼吸道收缩并伴随炎症, 该病理特征可能导致呼吸道结构发生变化, 且对过敏原、感染和空气污染物^[36] 发生较强烈的反应。哮喘的主要临床症状为咳嗽、呼吸急促、胸闷和喘息等, 是由呼吸道炎症受损而导致的黏液过度分泌、支气管高反应性和呼吸道粒细胞活化所引起的。哮喘的生物疗法主要针对患者 II 型细胞因子活性升高而定, 迄今为止, 已有 4 种被批准的药物可以直接抑制 II 型细胞因子, 其中美泊利单抗 (mepolizumab)、贝那利珠单抗 (benralizumab) 和瑞利珠单抗 (reslizumab) 等 3 种药物靶向细胞因子 IL-5 或其受体 (IL-5RA), 第 4 种药物度普利尤单抗 (dupilumab) 是靶向 IL-4 和 IL-13 的信号受体 IL-4RA^[37]。但这些单抗只能减轻呼吸道炎症反应, 并不能够加速受损肺脏的修复。有研究显示, 骨髓间充质干细胞 (bone marrow mesenchymal stem cell, BMSC) 可以减轻过敏性哮喘导致的肺部炎症, 促进呼吸道结构功能重塑^[38-39]。

MSC-Exo 似乎比 MSC 治疗具有更大的优势和更好的疗效。研究显示, 类固醇抵抗哮喘小鼠气管内给予 MSC-Exo 可以逆转气道高反应性、组织病理学改变和炎症反应; MSC-Exo 可通过重塑巨噬细胞极化、调控核因子- κ B (nuclear factor kappa-B, NF- κ B) 和磷酸酰肌醇-3-激酶/蛋白激酶 B (phosphatidylinositol 3 kinase/protein kinase B, PI3K/Akt) 信号通路来抑制肿瘤坏死因子受体相关因子 1 表达, 从而缓解炎症反应, 改善哮喘^[40]。另外一项研究也发现了外泌体在 MSC 免疫调节中起关键作用, 以 BMSC 分泌的外泌体处理哮喘患者外周血单个核细胞, 发现 MSC-Exo 上调外周血单个核细胞分泌的 IL-10 和 TGF- β_1 水平, 从而促进调节性 T 细胞的增殖和免疫抑制, 并提出了 MSC-Exo 治疗哮喘具有

巨大潜力的建议^[41]。

2 MSC-Exo 对急性肺损伤 (acute lung injury, ALI) 和急性呼吸窘迫综合征 (acute respiratory distress syndrome, ARDS) 的作用

ALI 与组织病理学上的弥漫性肺泡损伤相关。MSC-Exo 治疗 ALI 的分子调控机制比较复杂, 但可以肯定的是外泌体中 miR-30b-3p 升高对 ALI 有保护作用, miR-30b-3p 过表达可逆转脂多糖诱导的小鼠 ALI, 其机制可能是通过抑制肺泡上皮细胞凋亡、下调血清淀粉样蛋白 (serum amyloid a protein A3, SAA3) 表达而对肺损伤起到修复和功能改善作用^[42]。MSC-Exo 对光气诱导的 ALI 也有治疗作用, 其主要是通过降低机体 TNF- α 、IL-1 β 和 IL-6 水平、提高 IL-10 和表面活性蛋白 C 水平、抑制基质金属蛋白酶-9 合成等机制来发挥作用^[43]。MSC-Exo 还可以通过核因子 E2 相关因子 2/抗氧化反应原件和 NF- κ B 信号通路来逆转脂多糖诱导的 ALI^[44]。

肺部病毒感染常常伴随着 ALI。在一项猪流感病毒模型实验中发现了 MSC 源细胞外囊泡 (mesenchymal stem cell derived extracellular vesicle, MSC-EV) 具有抗病毒效果, 在流感病毒感染 12 h 后, 气管内给予 MSC-EV 后显著减少了流感病毒在鼻拭子中的病毒脱落和在肺部的复制, 以及肺部促炎细胞因子的产生, 该研究首次在大型动物中验证了 MSC-EV 的抗病毒和抗炎特性, 以及 EV 作为无细胞疗法治疗流感的可能性^[45]。因此, 将来 MSC-EV 极有可能成为人类流行性感冒的无细胞治疗策略。

细菌性肺炎是危重患者呼吸衰竭的主要原因之一。尽管支持性护理和适当使用抗生素可使细菌性肺炎症状有所改善, 但其发病率和患者的病死率仍然很高^[46]。MSC-EV 在治疗重症细菌性肺炎方面也疗效显著。MSC-EV 可通过促进角质形成细胞生长因子的分泌, 减少炎症细胞、细胞因子、蛋白质和细菌的流入, 减轻小鼠肺部损伤, 从而提高重症细菌性肺炎小鼠的生存率^[47]。EV 的摄取是由 CD44 受体介导的, EV 可以增强受损肺泡上皮 II 型细胞的单核细胞吞噬作用, 减少炎症细胞因子分泌, 提高细胞内 ATP 水平^[47]。在铜绿假单胞菌感染的肺炎小鼠中, 机体通过向肺泡运输 MSC-EV 来降低损伤肺泡内的细菌负荷^[48], 这可能与肺泡巨噬细胞经 MSC-EV 作用后具有较高的抗菌活性有关^[49]。

ARDS 与 ALI 具有性质相同的病理生理改变。ARDS 的特征是先天免疫细胞介导的肺泡-毛细血管屏障损坏、富含蛋白质的水肿液涌入小间隙和肺泡等, 常会导致进行性呼吸衰竭^[50]。虽然 ARDS 的

治疗和支持性护理措施已取得重大进展,但患者病死率仍在40%左右^[51]。新型冠状病毒肺炎(coronavirus disease 2019, COVID-19)是由严重急性呼吸综合征2型冠状病毒(severe acute respiratory syndrome coronavirus 2, SARS-CoV-2)感染引起的急性呼吸道传染病,传染性高、传播速度快,且该病毒具有很强的变异性,为疾病防控和治疗带来艰巨挑战,从而严重影响国内外经济发展和人民健康。COVID-19的治疗基本上依赖于患者自身的免疫系统,当免疫系统过度激活试图杀死病毒时,会产生大量的炎症因子,导致严重的细胞因子风暴,细胞因子风暴可引起器官损伤,继发水肿、肺换气功能障碍、ARDS、感染等,进而导致患者死亡^[52]。超过50%的重症监护患者血浆中粒细胞集落刺激因子和TNF- α 水平升高,因此,避免细胞因子风暴可能是治疗COVID-19的关键。MSC对自身免疫性疾病不仅可提供基于宿主细胞的免疫调节作用,还可防止组织纤维化,使肺功能障碍得以逆转,有助于受损组织的再生^[53]。一些临床前和临床研究探索了MSC和外泌体治疗COVID-19的潜力。2020年1月,首都医科大学附属北京佑安医院对7例COVID-19患者使用BMMSC进行治疗,结果显示,发热、呼吸急促、低氧饱和度等症状在治疗后2~4 d消失或改善^[50]。临床前研究显示, MSC-EV或其条件培养基(MSC derived conditional medium, MSC-CM)在各种疾病模型如支气管肺发育不良、哮喘、纤维化和慢性阻塞性肺疾病中的疗效与MSC治疗的疗效相似^[54],其可以强有效地调节免疫反应^[55],能够内源性修复并减少与COVID-19发病率和病死率相关的炎症反应^[56]。与MSC相比,外泌体具有显著优势,例如:可量产,且更易运输和保存,大大增加了成为货架商品的可能性;系统性给药毒性和血管栓塞风险更小;无致癌风险且可轻松穿越血脑屏障,并能高效到达目标或损伤部位等。另外, MSC-Exo可以在体内被修饰,释放具有更高免疫调节潜能的外泌体,故MSC-Exo可能是非常适合治疗COVID-19的药物^[55]。在美国医疗资源严重紧缺的情况下,对危重患者用人脐带MSC采取同情治疗来降低发病率和病死率,获得了政府和冠状病毒特别工作小组的认可^[52]。2020年4月, ExoFloTM(源于BMMSC的外泌体产品)被提供给某中心医院的24例重症COVID-19患者,在接受单次静脉注射ExoFloTM 15 mL治疗后第1~14天评估其安全性和有效性,结果显示患者存活率为83%^[57]。因此, MSC-Exo可能是缓解重症感染的优良选择,然而,其作用机制需要更多的临床前和临床研究来探索,并需进一步确定

其安全性和有效性。

3 MSC-Exo对慢性阻塞性肺疾病(chronic obstructive pulmonary disease, COPD)的作用

COPD是一种呼吸系统疾病,根据世界卫生组织统计数据显示, COPD是世界第3致死疾病,2019年死亡人数高达3.23百万^[58],在中国COPD形式也很严峻,40岁和60岁以上人群的发病率分别高达13.7%和40.0%^[59]。目前仍缺乏有效的治疗方法来改善肺结构异常并逆转COPD的进展。而以MSC及其外泌体为基础的治疗方法在COPD治疗中备受关注,并显示出良好的临床应用前景。研究显示, MSC-Exo对COPD大鼠模型具有显著的治疗作用,可抑制支气管和血管周围的炎症反应,使肺泡间隔增厚,杯状细胞数量减少,同时降低肺组织中亚基p65的表达水平^[60]。塞尔维亚克拉古耶瓦茨大学医学院微生物学、分子医学和干细胞研究中心设计出MSC衍生产品“Exosome-derived multiple allogeneic protein paracrine signaling (Exo-d-MAPPS)”, Exo-d-MAPPS含有高浓度的免疫调节因子,包括可溶性TNF受体I和II、IL-1受体拮抗剂和晚期糖基化终产物可溶性受体,这些因子能够减轻慢性呼吸道炎症;实验研究显示, Exo-d-MAPPS可以显著改善COPD小鼠的呼吸功能,下调血清炎症因子(TNF- α 、IL-1 β 、IL-12和IFN- γ)水平,上调血清免疫抑制因子IL-10水平,减轻慢性呼吸道炎症;在肺细胞组成方面, Exo-d-MAPPS处理可减少肺浸润的巨噬细胞、中性粒细胞、自然杀伤细胞和自然杀伤T细胞中炎症细胞因子的产生,并减弱肺浸润的巨噬细胞和树突状细胞的抗原提呈特性;此外, Exo-d-MAPPS可促进炎症肺部产生免疫抑制IL-10,交替激活巨噬细胞、调节性树突状细胞和CD4 + FoxP3 + 调节性T细胞,从而减轻慢性呼吸道炎症^[41]。临床研究显示, Exo-d-MAPPS可以显著改善COPD患者的肺功能和生活质量,且Exo-d-MAPPS耐受性良好,30例COPD患者在使用Exo-d-MAPPS后均未出现任何不良反应^[61]。

4 MSC-Exo对肺纤维化的作用

特发性肺纤维化(idiopathic pulmonary fibrosis, IPF)为肺纤维化最常见的类型,其是一种慢性、进行性、不可逆的间质性肺疾病^[62],通常具有致命性,患者确诊后生存期为3~5 a^[63]。IPF的组织病理学特征主要为胸膜下纤维化、成纤维细胞灶(显微镜下呈蜂窝状)。肺纤维化的发病机制复杂,涉及多种危险因素,包括环境暴露、吸烟、慢性病毒感染等。

肺纤维化的传统治疗方法有药物治疗、肺移植、长期氧气治疗、姑息治疗等,而 MSC 治疗作为一种新兴的治疗方法,已被大量临床前研究和正在进行的临床试验证明具有十分广阔的应用前景^[63]。

近期临床前研究证明, MSC-Exo 对 IPF 的治疗效果取得了可喜的成绩。MSC-Exo 可治疗小鼠高氧诱发的肺纤维化和肺损伤,减轻高氧症相关炎症,改变高氧肺转录组,减少纤维化和肺血管重塑,改善肺动脉高压,其作用机制与调节肺巨噬细胞表型有关^[64]。一项对博莱霉素诱导的 C57BL/6 肺纤维化小鼠模型的研究显示,骨髓来源的 MSC-Exo 可调节肺巨噬细胞表型,使肺促炎症经典和非经典途径的单核和巨噬细胞的比例向正常的转变^[65]。人脐带来源的 MSC-Exo 可调节二氧化硅诱导的肺纤维化小鼠的肺功能,其机制可能是通过抑制 TGF- β_1 /Smad2/3 信号通路激活的上皮间质转化来缓解肺纤维化^[66]。总之,由于外泌体自身组成的复杂性,导致 MSC-Exo 对肺纤维化的调节机制也异常复杂,尚需要更多的研究来进一步阐明其详细机制。

5 MSC-Exo 对肺动脉高压 (pulmonary arterial hypertension, PAH) 的作用

PAH 是一种以小肺动脉平滑肌细胞增生和肥大病理改变的疾病,其主要特征是肺动脉重构、肺浸润增加、血管横断面损失等,从而导致平均肺动脉压增加和右心室负荷过重^[67]。研究显示, PAH 的严重程度与受刺激或发生凋亡的内皮细胞释放的循环细胞外囊泡的增加有关,可能是由于可溶性血管细胞黏附分子-1 的释放及促炎标志物如单核细胞趋化蛋白和高度特异性 C 反应蛋白水平升高所致^[68]。有研究发现,野百合碱诱导的 PAH 小鼠给予 MSC-Exo 治疗后,经 miRNA 微阵列芯片分析发现, MSC-Exo 可以逆转右心室/(左心室 + 室间隔)之比,降低肺动脉壁厚度与直径之比;对野百合碱诱导的 PAH 小鼠和先天性 PAH 患者的血浆分析发现, miR-19b、miR-20a、miR-20b 和 miR-145 表达水平升高,而使用 MSC-Exo 治疗后,具有抗炎和抗恶性细胞增生作用的 miR-34a、miR-122、miR-124 和 miR-127 表达水平升高,提示 MSC-Exo 可根据其运载的 miRNA 调节 PAH^[69]。MSC-Exo 的这些功能可为 PAH 提供新的治疗策略。

6 讨论

细胞外囊泡或外泌体作为细胞间通讯交流的载体,参与多种病理生理过程。与细胞治疗相比,外泌

体具有更低的免疫原性和成瘤风险,且基本不涉及伦理问题。在材料学方面,外泌体是天然的纳米材料,具有更好的组织相容性和更高的治疗安全性,而且其来源广泛,易于获取,大大降低了细胞治疗成本。通过目前已有的基因工程、细胞工程及外泌体工程等手段,可对外泌体所携带的信号分子进行特定修饰,制备成具有特定功能的工程化外泌体,用于各种疾病的临床治疗。

基于上述优势,外泌体治疗在生物医学领域的应用正在迅速崛起。从 1946 年首次观察到细胞外囊泡至今,其研究热度逐年上涨,在疾病的临床诊断和治疗中展现出巨大的应用前景。在临床疾病精准诊断中,细胞外囊泡或外泌体可用于肿瘤、感染性疾病、自身免疫性疾病、肾脏疾病、内分泌疾病及心血管疾病等的诊断。同时,人类血液外泌体 RNA 数据库的构建极大方便了对癌症患者的溯源研究。在疾病治疗方面, MSC-Exo 主要被用于减缓炎症反应、肿瘤免疫治疗、逆转认知功能衰退、改善压疮愈合、预防老年性骨丢失及缺血性疾病、肝脏疾病、呼吸系统疾病的治疗等。

经典的外泌体治疗途径主要包括肌内注射和静脉注射,而雾化吸入是治疗呼吸系统疾病的最佳方式之一。MSC-CM 或 MSC-Exo 中的活化因子通过雾化吸入可直接到达呼吸道和肺泡,借助趋化作用归巢于受损组织,激活免疫细胞,调节机体免疫应答。相较于传统的静脉途径和滴鼻给药等治疗方式,雾化吸入能够使载药外泌体更准确地到达靶器官,为哮喘、鼻炎、肺炎、IPF、上呼吸道感染、ARDS 等提供了一种更加安全、有效、方便的治疗方式。美国北卡罗莱纳州立大学程柯教授带领的团队研究发现,通过雾化吸入方式输送肺干细胞分泌物(包括外泌体和其他细胞分泌因子)可修复小鼠和大鼠因 IPF 所致的肺损伤^[70]。为更快推动这一雾化治疗的临床转化,程柯教授联合发起成立了 BreStem Therapeutics 公司,提交了多个针对分泌组和外泌体治疗肺部疾病的新药临床申请。在应用 MSC-Exo 抑制炎症因子和增强机体免疫力方面,《间充质干细胞外泌体雾化吸入治疗新型冠状病毒肺炎 (COVID-19) 的关键技术研究》项目 (ChiCTR2000030261) 已在中国临床试验注册中心登记注册,其治疗方式也是通过雾化吸入肺直接接触病灶,通过分泌多种生长因子改善肺部细胞微环境,修复损伤细胞,促进血管新生,提高机体免疫应答,减少并发症。

研究显示,细胞外囊泡和其他纳米颗粒会在肺

毛细血管中积聚,对肺癌等病症的治疗是有益的,但对慢性阻塞性肺疾病或哮喘的治疗效果并不理想,如果颗粒卡在毛细血管里,不能从血液中渗出到肺组织,可能看不到很好的治疗效果;任何通过细胞外囊泡运载核酸药物的吸入治疗均面临肺积液的挑战,肺下层的表面活性剂也会破坏脂质体和脂质纳米颗粒的稳定^[63,71]。同时,细胞外囊泡或外泌体治疗机制的复杂性也将使科学家们的研究进入下一个瓶颈期,阐明细胞外囊泡或外泌体治疗疾病的机制势必成为巨大的挑战。

另外,综合目前外泌体的基础研究成果发现,从基础研究成品到临床转化还存在很大问题。首先是外泌体如何实现稳定的大规模量产;其次是生产出来的外泌体如何实现快速鉴定和标准化的有效质控;再者是外泌体的复杂成分要通过哪些分析方法进行定性、定量分析。虽然目前已开发出十余种外泌体的分离提取方法,但由于设备的局限、昂贵的分离试剂成本、分离纯化工艺操作的复杂性等,均无法实现大规模批量生产。而对于已经小量分离出来的用于科学研究的外泌体,需要做进一步的性能和纯度的鉴定和确认,相关技术也在不断涌现,如蛋白质组学、纳米流式、质谱或微阵列等,但尚无金标准来确定科研所使用的外泌体。在整个分离纯化的工艺过程中,超速离心力等外力对外泌体挤压造成外泌体形变,该作用力对外泌体自身功效的影响也需要进一步探讨研究;而且,外泌体组成的复杂性也决定了后期分析验证方法的开发和质量控制的复杂性,这些都将成为未来外泌体从基础研究向临床转化的热点和难点。

参考文献:

- [1] ZAR M, GUIDETTI G, CAMERA M, *et al.* Biology and role of extracellular vesicles (EVs) in the pathogenesis of thrombosis [J]. *Int J Mol Sci Int J Mol Sci*, 2019, 20(11):2840.
- [2] GAO Y S, RAJ J U. Extracellular vesicles as unique signaling messengers: role in lung diseases [J]. *Compr Physiol*, 2020, 11(1):1351-1369.
- [3] RAFAL S, MONIKA B K, JAKUB Z, *et al.* The methods of choice for extracellular vesicles (EVs) characterization [J]. *Int J Mol Sci*, 2017, 18(6):1153.
- [4] FAMILTSEVA A, JEREMIC N, TYAGI S C. Exosomes: cell-created drug delivery systems [J]. *Mol Cell Biochem*, 2019, 459(1/2):1-6.
- [5] RAGNI E, BANFI F, BARILANI M, *et al.* Extracellular vesicle-shuttled mRNA in mesenchymal stem cell communication [J]. *Stem cells*, 2017, 35(4):1093-1105.
- [6] ZAR M, GUIDETTI G F, CAMERA M, *et al.* Biology and role of extracellular vesicles (EVs) in the pathogenesis of thrombosis [J]. *Int J Mol Sci*, 2019, 20(11):2840.
- [7] EL ANDALOOUSS I S, MÄGER I, BREAKFIELD X O, *et al.* Extracellular vesicles: biology and emerging therapeutic opportunities [J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2013, 12(5):347-357.
- [8] KALLURI R, LEBLEU V S. The biology, function, and biomedical applications of exosomes [J]. *Science*, 367(6478):eaau6977.
- [9] SIMPSON R J, GREENING D W. Part II: special issue on extracellular vesicles and exosomes [J]. *Proteomics*, 2019, 19(8):1900121.
- [10] HARRELL C R, SIMOVIC MARKOVIC B, FELLABAUM C, *et al.* Therapeutic potential of mesenchymal stem cell-derived exosomes in the treatment of eye diseases [J]. *Adv Exp Med Biol*, 2018, 1089:47-57.
- [11] KIKUCHI-TAURA A, TAGUCHI A, KANDA T, *et al.* Human umbilical cord provides a significant source of unexpanded mesenchymal stromal cells [J]. *Cytotherapy*, 2012, 14(4):441-50.
- [12] BARI E, FERRAROTTI I, TORRE M, *et al.* Mesenchymal stem/stromal cell secretome for lung regeneration: the long way through "pharmaceuticalization" for the best formulation [J]. *J Control Release*, 2019, 309:11-24.
- [13] KASSEM D, KAMAL M. Mesenchymal stem cells and their extracellular vesicles: a potential game changer for the COVID-19 crisis [J]. *Front Cell Dev Biol*, 2020, 8:587866.
- [14] QIN H, ZHAO A. Mesenchymal stem cell therapy for acute respiratory distress syndrome: from basic to clinics [J]. *Protein Cell*, 2020, 11(10):707-722.
- [15] SHAHD H, LAFFEY J G. Recent insights: mesenchymal stromal/stem cell therapy for acute respiratory distress syndrome [J]. *F1000 Res*, 2016, 5:1532.
- [16] CRUZ F F, ROCCO P. Stem-cell extracellular vesicles and lung repair [J]. *Stem Cell Investig*, 2017, 4(9):78.
- [17] LAI R C, YEO R W, LIM S K. Mesenchymal stem cell exosomes [J]. *Semin Cell Dev Biol*, 2015, 40:82-88.
- [18] DOMENIS R, CIF A, QUAGLIA S, *et al.* Pro inflammatory stimuli enhance the immunosuppressive functions of adipose mesenchymal stem cells-derived exosomes [J]. *Sci Rep*, 2018, 8(1):13325.
- [19] VER NICA, MIGUEL S-M F, BEATRIZ M-G, *et al.* The immunomodulatory activity of extracellular vesicles derived from endometrial mesenchymal stem cells on CD4⁺ T cells is partially mediated by TGF- β [J]. *J. Tissue Eng Regen Med*, 2018, 12(10):2088-2098.
- [20] HA D H, KIM H, LEE J, *et al.* Mesenchymal stem/stromal cell-derived exosomes for immunomodulatory therapeutics and skin regeneration [J]. *Cells*, 2020, 9(5):1157.
- [21] JI L, BAO L, GU Z, *et al.* Comparison of immunomodulatory properties of exosomes derived from bone marrow mesenchymal stem cells and dental pulp stem cells [J]. *Immunol Res*, 2019, 67(4/5):432-442.
- [22] NAKAMURA Y, MIYAKI S, ISHITOB I H, *et al.* Mesenchymal-stem-cell-derived exosomes accelerate skeletal muscle regeneration [J]. *FEBS Letters*, 2015, 589(11):1257-1265.
- [23] MIANEHSAZ E, MIRZAEI H R, MAHJOUBIN-TEHRAN M, *et al.* Mesenchymal stem cell-derived exosomes: a new therapeutic approach to osteoarthritis [J]. *Stem Cell Res Ther*, 2019, 10(1):340.

- [24] HAO Z C, LU J, WANG S Z, *et al.* Stem cell-derived exosomes: a promising strategy for fracture healing [J]. *Cell Proliferation*, 2017, 50(5): e12359.
- [25] FURUTA T, MIYAKI S, ISHITOBI H, *et al.* Mesenchymal stem cell-derived exosomes promote fracture healing in a mouse model [J]. *Stem Cell Transl Med*, 2016, 5(12): 1620-1630.
- [26] LOU G, CHEN Z, ZHENG M, *et al.* Mesenchymal stem cell-derived exosomes as a new therapeutic strategy for liver diseases [J]. *Exp Mol Med*, 2017, 49(6): e346.
- [27] RIAZIFAR M, MOHAMMADI M, PONE E, *et al.* Stem cell-derived exosomes as nanotherapeutics for autoimmune and neurodegenerative disorders [J]. *ACS Nano*, 2019, 13(6): 6670-6688.
- [28] SUGAYA K, VAIDYA M. Stem cell therapies for neurodegenerative diseases [J]. *Adv Exp Med Biol*, 2018, 1056: 61-84.
- [29] SUN Y, SHI H, YIN S, *et al.* Human mesenchymal stem cell derived exosomes alleviate type 2 diabetes mellitus by reversing peripheral insulin resistance and relieving β -cell destruction [J]. *ACS Nano*, 2018, 12(8): 7613-7628.
- [30] SHARMA A. Role of stem cell derived exosomes in tumor biology [J]. *Int J Gynecol Cancer*, 2018, 142(6): 1086-1092.
- [31] HUANG C C, NARAYANAN R, ALAPATI S, *et al.* Exosomes as biomimetic tools for stem cell differentiation; applications in dental pulp tissue regeneration [J]. *Biomaterials*, 2016, 111: 103-115.
- [32] CHEW J, CHUAH S, TEO K, *et al.* Mesenchymal stem cell exosomes enhance periodontal ligament cell functions and promote periodontal regeneration [J]. *Acta Biomater*, 2019, 89: 252-264.
- [33] YANG P C. Induced pluripotent stem cell (iPSC)-derived exosomes for precision medicine in heart failure [J]. *Circ Res*, 2018, 122(5): 661-663.
- [34] JUNG J H, FU X, YANG P C. Exosomes generated from iPSC-derivatives; new direction for stem cell therapy in human heart diseases [J]. *Circ Res*, 2017, 120(2): 407-417.
- [35] VON MUTIUS E, SMITS H H. Primary prevention of asthma; from risk and protective factors to targeted strategies for prevention [J]. *Lancet*, 2020, 396(10254): 854-866.
- [36] MARTINEZ F D, VERCELLI D. Asthma [J]. *Lancet*, 2013, 382(9901): 1360-1372.
- [37] PETERS M C, WENZEL S E. Intersection of biology and therapeutics; type 2 targeted therapeutics for adult asthma [J]. *Lancet*, 2020, 395(10221): 371-383.
- [38] ABREU S C, ANTUNES M A, DE CASTRO J C, *et al.* Bone marrow-derived mononuclear cells vs. mesenchymal stromal cells in experimental allergic asthma [J]. *Respir Physiol Neurobi*, 2013, 187(2): 190-198.
- [39] LATHROP M J, BROOKS E M, BONENFANT N R, *et al.* Mesenchymal stromal cells mediate Aspergillus hyphal extract-induced allergic airway inflammation by inhibition of the Th17 signaling pathway [J]. *Stem Cell Transl Med*, 2014, 3(2): 194-205.
- [40] DONG B, WANG C, ZHANG J, *et al.* Exosomes from human umbilical cord mesenchymal stem cells attenuate the inflammation of severe steroid-resistant asthma by reshaping macrophage polarization [J]. *Stem Cell Res Ther*, 2021, 12(1): 204.
- [41] DU Y, ZHUANSUN Y, CHEN R, *et al.* Mesenchymal stem cell exosomes promote immunosuppression of regulatory T cells in asthma [J]. *Exp Cell Res*, 2018, 363(1): 114-120.
- [42] YI X, WEI X, LV H, *et al.* Exosomes derived from microRNA-30b-3p-overexpressing mesenchymal stem cells protect against lipopolysaccharide-induced acute lung injury by inhibiting SAA3 [J]. *Exp Cell Res*, 2019, 383(2): 111454.
- [43] XU N, SHAO Y, YE K, *et al.* Mesenchymal stem cell-derived exosomes attenuate phosgene-induced acute lung injury in rats [J]. *Inhalation Toxicol*, 2019, 31(2): 52-60.
- [44] LI J, DENG X, JI X, *et al.* Mesenchymal stem cell exosomes reverse acute lung injury through Nrf-2/ARE and NF- κ B signaling pathways [J]. *Peer J*, 2020, 8: e9928.
- [45] KHATRI M, RICHARDSON L A, MEULLA 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.
- [46] RUBENFELD G D, CALDWELL E, PEABODY E, *et al.* Incidence and outcomes of acute lung injury [J]. *New Engl J Med*, 2005, 353(16): 1685-1693.
- [47] MONSEL A, ZHU Y, GENNAI S, *et al.* Therapeutic effects of human mesenchymal stem cell-derived microvesicles in severe pneumonia in mice [J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2015, 192(3): 324-336.
- [48] ZHOU L, HAO Q, SUGITA S, *et al.* Role of CD44 in increasing the potency of mesenchymal stem cell extracellular vesicles by hyaluronic acid in severe pneumonia [J]. *Stem Cell Res Ther*, 2021, 12(1): 293.
- [49] PARK J, KIM S, LIM H, *et al.* Therapeutic effects of human mesenchymal stem cell microvesicles in an ex vivo perfused human lung injured with severe pneumonia [J]. *Thorax*, 2019, 74(1): 43-50.
- [50] THOMPSON B T, CHAMBERS R C, LIU K D. Acute respiratory distress syndrome [J]. *N Engl J Med*, 2017, 377(6): 562-572.
- [51] LI L, JIN S, ZHANG Y. Ischemic preconditioning potentiates the protective effect of mesenchymal stem cells on endotoxin-induced acute lung injury in mice through secretion of exosome [J]. *Int J Clin Exp Med*, 2015, 8(3): 3825-3832.
- [52] ATLURI S, MANCHIKANTI L, HIRSCH J A. Expanded umbilical cord mesenchymal stem cells (UC-MSCs) as a therapeutic strategy in managing critically ill COVID-19 patients; the case for compassionate use [J]. *Pain Physician*, 2020, 23(2): E71-E83.
- [53] CHRZANOWSKI W, KIM S Y, MCCLEMENTS L. Can stem cells beat COVID-19: advancing stem cells and extracellular vesicles toward mainstream medicine for lung injuries associated with SARS-CoV-2 infections [J]. *Front Bioeng Biotechnol*, 2020, 8: 554.
- [54] EIRO N, CABRERA J R, FRAILE M, *et al.* The coronavirus pandemic (SARS-CoV-2): new problems demand new solutions, the alternative of mesenchymal (stem) stromal cells [J]. *Front Cell Dev Biol*, 2020, 8: 645.

- vascular smooth muscle cell migration by regulating focal adhesion turnover and force polarization[J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2014,307(7):H945-H957.
- [33] YEH C C, WU J Y, LEE G L, *et al.* Vanadium derivative exposure promotes functional alterations of VSMCs and consequent atherosclerosis via ROS/p38/NF- κ B-mediated IL-6 production[J]. *Int J Mol Sci*, 2019,20(24):6115.
- [34] ZHANG J, CAI W, FAN Z, *et al.* MicroRNA-24 inhibits the oxidative stress induced by vascular injury by activating the Nrf2/Ho-1 signaling pathway[J]. *Atherosclerosis*, 2019,290:9-18.
- [35] ZHOU J, ZHANG L, ZHENG B, *et al.* Salvia miltiorrhiza bunge exerts anti-oxidative effects through inhibiting KLF10 expression in vascular smooth muscle cells exposed to high glucose[J]. *J Ethnopharmacol*, 2020,262:113208.
- [36] 倪钧. 氧化应激相关酶介导心血管病中血管内膜增生的机制[J]. *国际心血管病杂志*, 2016,43(6):362-364.
- [37] BARTON M, MEYER M R, PROSSNITZ E R. Nox1 downregulators: a new class of therapeutics[J]. *Steroids*, 2019,152:108494.
- [38] MANEA A, MANEA S A, GAN A M, *et al.* Human monocytes and macrophages express NADPH oxidase 5; a potential source of reactive oxygen species in atherosclerosis[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2015,461(1):172-179.
- [39] 孟利民, 杨华, 信栓力, 等. 重组人 B 型利钠肽抑制氧化低密度脂蛋白诱导的巨噬细胞氧化应激及炎症反应[J]. *中国心血管杂志*, 2018,23(6):490-494.
- [40] KATTOOR A J, GOEL A, MEHTA J L, *et al.* LOX-1; regulation, signaling and its role in atherosclerosis[J]. *Antioxidants (Basel)*, 2019,8(7):218.
- [41] ZHANG H, LIU Q, LIN J L, *et al.* Recombinant human thioredoxin-1 protects macrophages from oxidized low-density lipoprotein-induced foam cell formation and cell apoptosis[J]. *Biomol Ther (Seoul)*, 2018,26(2):121-129.
- [42] WANG Y, JI N, GONG X, *et al.* Thioredoxin-1 attenuates atherosclerosis development through inhibiting NLRP3 inflammasome[J]. *Endocrine*, 2020,70(1):65-70.
- [43] HAO S, JI J, ZHAO H, *et al.* Mitochondrion-targeted peptide SS-31 inhibited oxidized low-density lipoproteins-induced foam cell formation through both ROS scavenging and inhibition of cholesterol influx in RAW264.7 cells[J]. *Molecules*, 2015,20(12):21287-21297.

(本文编辑:周二强)

(上接第 1089 页)

- [55] JAYARAMAYYA K, MAHALAXMI I, SUBRAMANIAM M D, *et al.* Immunomodulatory effect of mesenchymal stem cells and mesenchymal stem-cell-derived exosomes for COVID-19 treatment[J]. *BMB Rep*, 2020,53(8):400-412.
- [56] GUPTA A, KASHTE S, GUPTA M, *et al.* Mesenchymal stem cells and exosome therapy for COVID-19; current status and future perspective[J]. *Hum Cell*, 2020,33(4):907-918.
- [57] SENGUPTA V, SENGUPTA S, LAZO A, *et al.* Exosomes derived from bone marrow mesenchymal stem cells as treatment for severe COVID-19[J]. *Stem Cells Dev*, 2020,29(12):747-754.
- [58] WORLD HEALTH ORGANIZATION. The top 10 causes of death [EB/OL]. (2020-12-09) [2021-01-10]. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/the-top-10-causes-of-death>.html.
- [59] WANG C, XU J, YANG L, *et al.* Prevalence and risk factors of chronic obstructive pulmonary disease in China(the China Pulmonary Health[CPH] study): a national cross-sectional study[J]. *Lancet*, 2018,391(10131):1706-1717.
- [60] RIDZUAN N, ZAKARIA N, WIDERA D, *et al.* Human umbilical cord mesenchymal stem cell-derived extracellular vesicles ameliorate airway inflammation in a rat model of chronic obstructive pulmonary disease(COPD)[J]. *Stem Cell Res Ther*, 2021,12(1):54.
- [61] HARRELL C, MILORADOVIC D, SADIKOT R, *et al.* Molecular and cellular mechanisms responsible for beneficial effects of mesenchymal stem cell-derived product "Exo-d-MAPPS" in attenuation of chronic airway inflammation[J]. *Anal Cell Pathol*, 2020,2020:3153891.
- [62] WOLTERS P J, BLACKWELL T S, EICKELBERG O, *et al.* Time for a change; is idiopathic pulmonary fibrosis still idiopathic and only fibrotic[J]. *Lancet Resp Med*, 2018,6(2):154-160.
- [63] MARTINEZ F J, COLLARD H R, PARDO A, *et al.* Idiopathic pulmonary fibrosis[J]. *Nat Rev Dis Primers*, 2017,3:17074.
- [64] WILLIS G R, FERNANDEZ-GONZALEZ A, ANASTAS J, *et al.* Mesenchymal stromal cell exosomes ameliorate experimental bronchopulmonary dysplasia and restore lung function through macrophage immunomodulation[J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2018,197(1):104-116.
- [65] MANSOURI N, WILLIS G R, FERNANDEZ-GONZALEZ A, *et al.* Mesenchymal stromal cell exosomes prevent and revert experimental pulmonary fibrosis through modulation of monocyte phenotypes[J]. *JCI Insight*, 2019,4(21):e128060.
- [66] YANG J, HU H, ZHANG S, *et al.* Human umbilical cord mesenchymal stem cell-derived exosomes alleviate pulmonary fibrosis in mice by inhibiting epithelial-mesenchymal transition[J]. *J South Med Univ*, 2020,40(7):988-994.
- [67] WILLIS G R, FERNANDEZ-GONZALEZ A, REIS M, *et al.* Macrophage immunomodulation: the gatekeeper for mesenchymal stem cell derived-exosomes in pulmonary arterial hypertension[J]. *Int J Mol Sci*, 2018,19(9):2534.
- [68] BAKOUBOULA B, MOREL O, FAURE A, *et al.* Procoagulant membrane microparticles correlate with the severity of pulmonary arterial hypertension[J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2008,177(5):536-543.
- [69] ALIOTTA J M, PEREIRA M, WEN S, *et al.* Exosomes induce and reverse monocrotaline-induced pulmonary hypertension in mice[J]. *Cardiovasc Res*, 2016,110(3):319-330.
- [70] DINH P, PAUDEL D, BROCHU H, *et al.* Inhalation of lung spheroid cell secretome and exosomes promotes lung repair in pulmonary fibrosis[J]. *Nat Commun*, 2020,11(1):1064.
- [71] KEIL T, MERKEL O. Dry powder inhalation of siRNA[J]. *Ther Deliv*, 2019,10(5):265-267.

(本文编辑:徐自超)