间充质干细胞来源的细胞外囊泡在机体修复及疾病治疗中的应用研究

古增^{1,2}, 梁胜贤^{1,2}, 刘冬雪^{1,2}, 郭蕊, 钟理^{1,2*}

1. 河北大学生命科学学院, 保定 071002;

2. 河北大学生命科学与绿色发展研究院, 保定 071002

* 联系人, E-mail: lee_z@yahoo.com

收稿日期: 2021-06-10; 接受日期: 2021-07-02; 网络版发表日期: 2021-09-15

国家自然科学基金(批准号: 81773178)资助

摘要 间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSCs)作为一种成体干细胞, 不仅具有干细胞固有的增殖分化能力, 而且还拥有强大的免疫调节功能, 所以在机体修复及炎症疾病的治疗中显示出广阔的应用前景. 在近几年的研究中, 越来越多的证据表明, MSCs的作用机制主要是通过其细胞旁分泌分泌出的细胞外囊泡(extracellular vesicles, EVs)而实现的. MSCs所分泌的EVs具有其亲本细胞的生物学特性, 并且在许多疾病模型中有显著的治疗效果. 研究表明, MSCs所分泌的EVs存在大量microRNA的富集, 而microRNA的富集与血管生成、细胞凋亡和生长等功能有密切的关联. 此外, EVs中还包含有源自MSCs的mRNA、细胞因子、趋化因子、免疫调节因子等生物活性分子, 这些因素都在机体组织损伤修复和疾病治疗方面发挥着重要作用. 本文总结了最新的关于MSCs-EVs的应用与研究进展, 为深入讨论MSCs-EVs的作用机制及临床应用前景提供了综合信息.

关键词 间充质干细胞, 细胞外囊泡, 组织损伤修复, 再生医学, microRNA

间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSCs)是能分化为间充质谱系的多能干细胞, 能分化成中胚层谱系(脂肪细胞、骨细胞和软骨细胞), 外胚层谱系(神经细胞)和内胚层谱系(肝细胞)^[1,2], 可以从骨髓、脐带血、脂肪等组织中分离, 易于在体外培养. MSCs细胞体包含一个大的圆形核, 带有突出的核仁且核仁被分散的染色质颗粒包围, 使得细胞核外观清晰^[3,4]. MSCs没有明确独特的标记, 国际细胞治疗协会(International Society for Cellular Therapy, ISCT)建立了一个最低标准, MSCs必须对CD105, CD73和CD90呈阳性, 表达低

水平的MHC-I, 对MHC-II, CD11b, CD14, CD34, CD45和CD31呈阴性^[5,6]. MSCs具有巨大的免疫抑制潜力以及在免疫疾病中具有治疗作用^[7]. 研究表明, MSCs可以通过与自然杀伤细胞(natural killer cell, NK)、树突状细胞(dendritic cell, DC)、B淋巴细胞和T淋巴细胞相互作用而影响免疫应答^[8]. MSCs的再生潜力非常大, 其再生潜力主要通过体外功能测定法得到验证. 很多研究表明, MSCs对多种损伤模型具有保护作用, 包括骨骼受损、软骨、肝、心肌、心脏和神经等组织^[9-13]. MSCs在再生医学领域中具有巨大的潜力, 以

引用格式: 古增, 梁胜贤, 刘冬雪, 等. 间充质干细胞来源的细胞外囊泡在机体修复及疾病治疗中的应用研究. 中国科学: 生命科学, 2021, 51: 1229-1240
Gu Z, Liang S X, Liu D X, et al. Novel development of mesenchymal stem cells-derived extracellular vesicles in regenerative medicine and disease therapeutics (in Chinese). Sci Sin Vitae, 2021, 51: 1229-1240, doi: 10.1360/SSV-2021-0219

往是通过将MSCs进行移植分化从而发挥作用,但是这种方法具有致癌性和免疫原性的风险^[14]。很多研究发现, MSCs在损伤组织的功能改善方面发挥功能主要是与MSCs的旁分泌作用有关^[15-17]。MSCs可以通过旁分泌功能分泌多种可溶性因子进行免疫调节,从而促进血管生成,抗凋亡和抗氧化作用^[18,19]。此外, MSCs可以通过释放包含修复性肽/蛋白质, mRNA和micro-RNA(miRNA)的细胞外囊泡(extracellular vesicles, EVs)来减少组织修复过程中的炎症并促进细胞增殖^[20-22]。综上所述, MSCs的治疗潜力主要归因于三个方面: (i) 通过分化成各种细胞谱系来替换受损的组织; (ii) 通过免疫调节功能调节免疫应答; (iii) 通过旁分泌功能分泌出细胞外囊泡转入受体细胞进行作用。图1为MSCs发挥治疗潜力示意图。

对于MSCs的旁分泌作用分泌的细胞外囊泡,人们的认识由以前认为仅有外泌体(exosomes)到现在还包含微泡颗粒(microvesicles)和凋亡小体(apoptotic bodies)^[23],并且发现MSCs分泌的细胞外囊泡在许多疾病治疗方面的应用与研究具有巨大的潜力。为了深入探究MSCs分泌的细胞外囊泡的作用机制以及在临床疾病上的应用前景,本文总结了MSCs分泌的细胞外囊泡的分离方法以及应用与研究进展。

1 间充质干细胞分泌的细胞外囊泡

根据国际细胞外囊泡协会的建议,细胞外囊泡包括外泌体、微泡颗粒和凋亡小体^[23]。EVs各个组分的起源、尺寸、功能、标记物和组成内容如表1所示。EVs的功能由其来源细胞决定, EVs内部包含了其来源组织细胞的特异性蛋白, mRNA以及microRNA等物质,不同组织细胞来源的EVs可以行使特定功能, EVs可以转移至受体细胞中发挥作用, 激活细胞内特定的信号传导

图 1 MSCs发挥治疗潜力的示意图
Figure 1 Schematic diagram of the therapeutic potential of MSCs

途径并影响细胞命运,是细胞间通讯的重要介质^[24]。所有细胞分泌的EVs均具有靶向受体细胞的表面分子, EVs被靶细胞吸收后,可以通过三种机制进行诱导信号传导: (i) 被内吞区室内化; (ii) 与膜直接融合; (iii) 特异性受体的识别和诱导的细胞内信号通路^[25]。

Haynesworth等人^[26]首次鉴定出MSCs旁分泌作用,表明MSCs的旁分泌作用会释放出相邻细胞间作用的生长因子、趋化因子和细胞因子。MSCs分泌的这些具有生物活性的因子可促进血管生成,减少细胞凋亡和纤维化,增强神经元存活,刺激细胞外基质重塑,限制局部炎症并调节免疫反应,因此, MSCs可以通过旁分泌诱导再生作用用于治疗损伤的细胞,减少组织损伤以及加速器官修复^[27-29]。研究表明, MSCs通过旁分泌作用衍生的生物活性因子对多种疾病具有治疗效果,包括免疫疾病、神经疾病、肝损伤、急性肾功能衰竭和心血管疾病以及软骨再生^[30]。这些研究都证实MSCs旁分泌作用释放的物质具有有效治疗的作用,

表 1 EVs各个组分的起源、尺寸、功能、标记物和组成
Table 1 Origin, size, function, markers, and composition of each component of EVs

EVs组分	起源	尺寸(nm)	功能	标记物	组成
外泌体	内吞途径	40~120	细胞间通讯	Alix, Tsg101, CD81, CD63, CD9, flotillin	蛋白质和核酸(mRNA, miRNA和其他非编码RNA)
微泡颗粒	质膜	50~1000	细胞间通讯	Integrins, selectins, CD40	蛋白质和核酸(mRNA, miRNA和其他非编码RNA)
凋亡小体	质膜	500~2000	促进吞噬作用	Annexin V	细胞器, 核成分

可以发挥与MSCs相似的生物学活性^[31]. 间充质干细胞分泌的细胞外囊泡(mesenchymal stem cells-derived extracellular vesicles, MSCs-EVs)在目前的研究中被着重探究的功能主要有两个: (i) 促进损伤组织的结构和功能恢复^[32]; (ii) 通过MSCs-EVs表达特定的microRNA并转移至受体细胞的特点, 将MSCs-EVs应用到microRNA表达失控的细胞中发挥作用^[33].

在目前对于MSCs-EVs的研究中, MSCs的来源主要是骨髓、脐带血、脂肪组织, 研究表明, 不同组织来源的MSCs-EVs所携带的蛋白质有所不同^[34], 但在不同组织来源的MSCs-EVs所含有的蛋白质中都包含了血管生成、炎症、凝血、细胞凋亡等与MSCs-EVs治疗作用密切相关的蛋白. 不同组织来源的MSCs-EVs在损伤修复以及疾病治疗中的差异性以及特异性目前尚未有明确的研究结果, 但可以通过对不同组织来源的MSCs-EVs的基因组以及蛋白质组进行测序分析从而选取对研究更有利的MSCs-EVs.

1.1 MSCs-EVs的蛋白质组学

所有细胞分泌的EVs都包含其来源组织细胞的特异性蛋白以及发挥基本运输功能的非特异性蛋白, MSCs也不例外. EVs内部含有的非特异性蛋白可以参与EVs的生物发生以及对EVs含有的物质进行分类, 控制EVs释放并促进EVs与受体细胞之间的相互作用. EVs的生物发生可以分为依赖ESCRT(endosomal sorting complex required for transport)途径和不依赖ESCRT途径^[35].

由于MSCs-EVs内部包含有其来源组织细胞的特异性蛋白, 为了探究MSCs-EVs内部所包含的特异性蛋白的作用, 目前有很多研究解析了MSCs-EVs的蛋白质组学特征. Kim等人^[36]从源自人骨髓的MSCs-EVs的蛋白质组学分析中鉴定出730种蛋白质, 这些蛋白包含了MSCs和EVs的标记以及调节MSCs自我更新和分化能力的信号分子, 此外, 还包含参与细胞增殖、黏附、迁移和形态发生的部分蛋白. Angulski等人^[37]从来源于人骨髓的MSCs-EVs中鉴定出797种蛋白, 其中约有60%与Kim等人鉴定出的蛋白质重叠. Anderson等人比较了常氧和低氧条件下来源于人骨髓MSCs-EVs的蛋白质组学特征, 共鉴定出1927种蛋白, 其中有457种在MSCs中并未出现, 这说明MSCs-EVs中蛋白质的富集比MSCs更丰富, 同时也表明低氧条件下的

MSCs-EVs促进了血管生成蛋白的表达, 包括血小板衍生的生长因子、成纤维细胞生长因子和表皮生长因子^[38]. 这些研究表明, MSCs-EVs包含的特异性蛋白与其在导入至受体细胞后发挥的作用以及MSCs的细胞功能特性密切相关, 并且在低氧条件培养的MSCs分泌的EVs可以表达出更多的蛋白.

1.2 MSCs-EVs分泌的MicroRNA

miRNA是19~25个核苷酸的短RNA分子, 在基因转录后表达的调控中具有重要作用^[39]. MSCs-EVs内部不仅包含其来源组织细胞的特异性蛋白和mRNA, 还包含大量的miRNA, 这些物质可以被受体细胞吸收转化并发挥作用. miRNA是目前在MSCs-EVs中研究最多的RNA. Nguyen团队^[40]通过NanoString对MSCs-EVs富集表达的miRNA进行分析, 共鉴定出171种miRNA, 其中23种含量较多, 占MSCs-EVs总miRNA含量的79.1%, 剩余的148种miRNA含量非常低, 作者进一步分析了含量较高的23种miRNA的功能, 这些富集表达的miRNA与心血管发育、血管生成、细胞凋亡和生长相关途径以及纤维化相关途径有关, 这与MSCs-EVs的治疗作用密切相关^[41].

2 MSCs-EVs的分离方法

MSCs-EVs包含有MSCs的特异性蛋白, mRNA以及miRNA等生物活性分子, 并且具有能够转入受体细胞发挥作用的特点, 因此MSCs-EVs在临床疾病治疗方面具有应用前景, 但是将MSCs-EVs从MSCs中分离出来是一个难点. 从MSCs中分离出具有高生物活性和功能的MSCs-EVs需要去除杂蛋白和其他可能存在的基质污染物等. 目前用于分离EVs的常用方法主要有五种, 分别是超速离心法、密度梯度离心法、尺寸排阻色谱(size-exclusion chromatography, SEC)法、基于免疫亲和力的分离方法以及使用商业试剂盒进行分离. 超速离心法以及商业试剂盒是用于分离MSCs-EVs中最为常用的两种方法. 从细胞中分离其分泌的细胞外囊泡最关键的步骤在于保护细胞不受污染, 因此只要在保证MSCs不被污染的前提下也能使用其他三种方法进行分离, 目前对于从MSCs中分离出细胞外囊泡并没有一个标准化的方法以及流程. 本文总结了当前常用的五种分离EVs方法的原理以及优缺点. EVs

各分离方法的原理以及优缺点如表2所示。

2.1 超速离心法

超速离心法是目前分离EVs的黄金标准^[42,43]。超速离心法分离EVs的原理是根据EVs的密度将其与其他样品组分和浓缩物分离^[44,45]。EVs的密度通常为1.13~1.19 g/mL^[46]。使用超速离心法分离EVs的主要步骤为^[47]：(i) 将含有细胞的培养基在500×g的转速条件下离心10 min, 弃除沉淀保留上清液, 这个步骤是为了将基体中的细胞碎片和较大的颗粒物沉淀出来；(ii) 将步骤(i)所得的上清液用0.22 μm的过滤器进行过滤, 将过滤后的上清液在10000×g的转速条件下离心30 min, 弃除沉淀保留上清液, 这个步骤进一步纯化了基质；(iii) 将步骤(ii)得到的上清液在100000×g的转速条件下离心60~90 min, 离心后EVs沉淀出现, 然后用PBS漂洗后再离心一次, 沉淀即为EVs, 在这个步骤中, 使用更长的离心时间可以增加EVs的产量, 但是也有研究表明, 离心时间高于4 h会对EVs造成机械损伤, 并且导致可溶性蛋白污染水平升高^[48]。

使用超速离心法分离EVs无法将EVs与细胞外空间的其他成分完全分离^[49], 可能会分离出除EVs以外的微粒, 包括病毒、脂蛋白颗粒和蛋白复合物^[50]。超速离心法所需要的超速离心机是一种昂贵的设备仪器, 但是长期使用超速离心法分离EVs相比于其他四种方法具有更高的性价比。

2.2 密度梯度离心法

密度梯度离心法是基于超速离心法的另外一种方法, 这种方法对EVs进行分离的原理也是基于EVs的尺

寸和密度。密度梯度离心法需要预先构造密度梯度, 蔗糖梯度和商业生产的OptiPrep密度梯度是目前应用密度梯度法分离EVs中最常用的两种介质^[51]。密度梯度离心法的主要过程是将样品放置梯度离心管的顶部, 施加离心力后样品中的颗粒以独特的速率通过梯度, 离心管中的梯度从上到下密度逐渐增加, 从而达到各物质分离的目的。EVs通过分馏收集过程被收集^[47], 通常是在密度范围为1.1~1.2 g/mL中进行, 因为EVs的密度为1.13~1.19 g/mL^[46]。密度梯度离心法适用于从蛋白质聚集体和非膜颗粒或从体液中分离EVs^[52]。

密度梯度离心法相对于超速离心法具有提高EVs纯度的优势, 但是这需要额外的时间进行梯度制备和护理, 防止在加速和减速期间梯度发生变化^[53]。

2.3 尺寸排阻色谱法

尺寸排阻色谱法是根据流体动力学体积分离样品成分的方法。SEC是简单、可靠且不需要昂贵设备的分离方法, 它可以在温和洗脱条件下进行使用^[54]。SEC法分离EVs与分离大小不同的蛋白质的方法类似, 在填充有多孔固定相的柱子中, 小颗粒可以渗透进入, 柱子会减慢较小颗粒通过速率, 因而EVs可以在较大颗粒通过之后在梯度中洗脱出来, 使用SEC法分离EVs同时也会有超速离心法的参与^[55]。

SEC法是对EVs下游蛋白质组学进行分析时常用的一种分离方法, 相比于超速离心法, 它能有效地分离出EVs中更多的蛋白^[56], 但是SEC法受到EVs分离物的低分辨率和稀释的限制。有证据表明, 使用SEC法分离EVs, 会受到脂蛋白颗粒、病毒颗粒、游离蛋白以及来自生物基质的蛋白复合物等物质的污染^[57]。

表2 EVs各分离方法的优点与缺点

Table 2 Advantages and disadvantages of EVs isolation methods

方法	原理	优点	缺点	参考文献
超速离心法	EVs的密度与其他组分不同	蛋白污染程度低	会分离出大小相似的颗粒物, EVs可能会受到损害	[42~50]
密度梯度离心法	EVs的密度与其他组分不同	EVs纯度高	需要额外的时间进行制备和护理	[51~53]
SEC法	流体动力学体积分离	蛋白污染程度低, 分离条件温和	EVs分离物低分辨率和低稀释度	[54~57]
基于免疫亲和力的分离方法	抗原-抗体特异性结合	纯化效率高	成本高	[58~61]
商业试剂盒	聚合物沉淀	EVs产量高, 流程简单	蛋白污染高, 成本高	[62~64]

2.4 基于免疫亲和力的分离方法

基于免疫亲和力的分离方法是根据具有高度特异性的抗原-抗体相互作用的原理进行分离的方法. 基于免疫亲和力的分离方法通过抗原-抗体特异性结合作用靶向特定的EVs, 从而减少其他颗粒物质的污染, 许多研究已经使用抗体对EVs进行分离^[58-60].

基于免疫亲和力的分离方法减少了分离时间并且提高了纯化特异性, 但是成本非常高, 并且会受到抗体的非特异性结合、竞争性抑制和交叉反应的问题, 而且抗体的使用次数有限, 从固定相中分离EVs也可能带来问题^[61].

2.5 商业试剂盒

目前在市场上已经出现了几种商业化的试剂盒对EVs进行分离, 这种试剂盒分离的EVs产量与超速离心法的产量相差不多, 而且不需要使用任何专用设备^[62]. 常用的试剂盒有: ExoQuick™ Exosome Precipitation Solution (Systems Bioscience), miRCURY™ (Exiqon), Total Exosome Isolation Reagent (Invitrogen)^[62-64].

使用商业试剂盒分离EVs可能会导致高水平的蛋白质污染且需要较长的分离流程, 而且它们的价格也非常昂贵, 此外, 这些试剂盒的专有配方还可能会干扰EVs的下游实验^[62].

3 MSCs-EVs在疾病治疗中的应用与研究进展

MSCs具有强大的分化潜能和自我更新能力, 因此MSCs在再生医学领域中具有巨大的治疗潜力^[7]. 在以往研究中, MSCs常通过移植分化而发挥作用, 然而, 这种方法可能会产生致癌性和免疫原性^[14]. 目前很多研究表明, MSCs发挥作用是通过其旁分泌作用进行的^[15-17], MSCs通过旁分泌作用分泌出包含修复性肽/蛋白质, mRNA和miRNA等其他的生物活性因子和趋化因子的MSCs-EVs来进行作用^[26]. MSCs-EVs在疾病治疗中的应用与研究具有miRNA途径以及非miRNA途径.

3.1 MSCs-EVs通过miRNA途径在疾病治疗中的应用与研究进展

在MSCs-EVs中高表达的miRNA主要与多器官的生长发育、细胞存活和免疫调节有关^[38]. 有关MSCs-EVs功能方面的研究不仅限于此, 还包括损伤修复、退行性疾病的治疗和肿瘤干预. 本文总结了MSCs-EVs表达的miRNA在疾病治疗中的作用以及它们的靶向或途径(表3).

(1) 炎症疾病. MSCs-EVs可以通过其表达的

表 3 MSCs-EVs表达的miRNA在疾病治疗中的应用与研究
Table 3 Application and research of miRNA expressed by MSCs-EVs in disease treatment

MSCs来源	分离方法	MSCs-EVs发挥作用的miRNA	疾病模型或临床疾病	靶标基因或途径	作用结果	参考文献
诱导性多能干细胞	超速离心法	miR-146a-5p	过敏性气道	IL-6, IL-13表达下调	调节了第2组先天性淋巴样细胞(group 2 innate lymphoid cells, ILC2)的体外功能以及ILC2占主导地位的过敏性气道炎症	[65]
鼠骨髓	超速离心法	miR-182	心肌缺血-再灌注损伤	TLR4, NF-κB p-P65表达下调, Arg-1, p-PI3K和p-AKT表达上调	促进巨噬细胞从M1型向M2型极化	[66]
鼠骨髓	商业试剂盒	miR-144	缺氧条件下的心肌细胞凋亡	PTEN/AKT途径	减少缺氧条件下的心肌细胞的凋亡	[67]
人骨髓	超速离心法	miR-200a-3p	肾脏缺血-再灌注损伤	KEAP1-Nrf2信号通路	保护线粒体, 促进肾功能恢复	[68]
人骨髓	超速离心法	miR-208a	骨髓肉瘤	下调程序性细胞死亡因子4(programmed cell death 4, PDCD4)和激活ERK1/2途径	促进肿瘤进展	[69]
人骨髓	商业试剂盒	miR-23b	转移性乳腺癌	抑制MARCKS表达	抑制肿瘤的增殖	[72]
人骨髓	超速离心法	miR-125a-3p	移植植物抗宿主病	抑制CD3 ⁺ T细胞活化	改善移植植物抗宿主病	[78]

miRNA调节和减少炎症以及抗纤维化。已有研究表明, 干细胞所衍生的EVs可以使其表达的miRNA在免疫紊乱的器官组织中进行正确有效的表达, 如过敏性气道^[65]。该研究发现, 在过敏性气道疾病中导入MSCs-EVs会上调miR-146a-5p的表达, 而导致第二组先天性淋巴细胞中白介素9(interleukin-9, IL-9)和白介素13(IL-13)表达下调, 从而调节过敏性疾病。这项研究表明, MSCs-EVs中表达的miR-146a-5p与过敏性疾病有关。MSCs-EVs中表达的miRNA可以促进巨噬细胞从M1的促炎表型转变为M2的抗炎表型, 这在心肌缺血-再灌注损伤研究中得到证明^[66]。该研究发现, MSCs-EVs中的miRNA可以影响巨噬细胞从M1抗炎表型向M2抗炎表型的转化, 并且伴随着促炎性细胞因子的减少, 例如白介素-1 β (IL-1 β)、白介素-6(IL-6)和肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor α , TNF- α), 从而调节免疫力。总的来说, MSCs-EVs表达的miRNA调控炎症反应主要是通过调节巨噬细胞和T细胞。MSCs-EVs中表达的miRNA可以减少巨噬细胞表面的Toll样受体4, 促进其从M1到M2的转化, 然后分泌各种抗炎因子。然而, MSCs-EVs对于炎症反应的调控机制和靶基因尚未被完全阐明, 需要进一步的研究。

(2) 组织损伤修复。MSCs-EVs中表达的miRNA也可以起到组织损伤修复的重要作用。MSCs-EVs中表达的miRNA通过促进细胞增殖和分化以及减少坏死和凋亡来实现损伤修复。MSCs-EVs中的miRNA, 如miR-144, miR-21-5p和miR-19a, 在到达受损组织后起防止细胞凋亡的作用。研究表明, MSCs-EVs表达的miR-144会下调PTEN, 激活Akt信号传导途径, 然后减少凋亡蛋白的表达(胱天蛋白酶3、胱天蛋白酶8、半胱氨酸蛋白酶9等)和凋亡细胞的数量^[67]。总体而言, 在人体受到损伤后, MSCs-EVs中的miRNA可能对重要器官(如脑、心脏和肺)中的细胞产生保护作用。最新的研究也发现, MSCs-EVs中表达的miR-200a-3p可以通过KEAP1-Nrf2信号通路在肾脏缺血再灌注损伤(ischemia-reperfusion injury, IRI)中保护线粒体, 从而促进肾功能的恢复^[68]。目前已知MSCs-EVs表达的miRNA可以在细胞质、线粒体和细胞核中起作用, 并且MSCs-EVs中表达的miRNA能否在其他细胞器中发挥作用也值得进一步研究。

(3) 肿瘤进展。MSCs-EVs对肿瘤的治疗存在争议, 一些研究表明MSCs-EVs可以促进肿瘤的发展, 有

一些研究则认为它们可以抑制肿瘤。一项关于骨肉瘤的研究表明, MSCs-EVs中表达的miR-208a通过下调程序性细胞死亡因子4(programmed cell death 4, PDCD4)和激活ERK1/2途径促进肿瘤进展^[69]。在这项研究中值得注意的是, MSCs来自骨髓, 而干细胞在肿瘤促进中的作用可能是由于相似的起源。在这项研究中, MSCs-EVs表达的miRNA促进了肿瘤的增殖、迁移和侵袭, 但在MSCs-EVs的其他研究中, 它也促进了血管生成, 然而miRNA在促进肿瘤血管生成中的作用尚未得到充分验证^[70]。在MSCs-EVs表达的miRNA抑制肿瘤作用的研究中发现, MSCs-EVs中表达的miR-146a是一种抑癌基因, 其在多发性骨髓瘤中起到肿瘤抑制的作用^[71]。MSCs-EVs中表达的miR-23b可以抑制肿瘤的增殖, 使其保持休眠状态, 从而改善患者生活质量, 并延长其寿命^[72]。在一项肝细胞癌研究中, MSCs-EVs不直接包含抗肿瘤miRNA, 但是转染了可以增强药物敏感性的miR-122, 然后通过质粒进入干细胞, 并通过MSCs-EVs作用到肿瘤细胞中, 从而增强抗肿瘤药物sorafenib的敏感性^[73]。除了提高化学敏感性外, 研究还表明, MSC中的miR-34c可以提高肿瘤对放疗的敏感性^[74]。这些研究表明, 在治疗肿瘤时, MSCs-EVs可以与其他疗法(如化学疗法药物和放射疗法)结合使用。综上所述, MSCs-EVs会促进肿瘤发展, 因此用MSCs过量表达某些已知的抗癌miRNA或通过MSCs-EVs分泌的miRNA进行辅助作用会更安全。

(4) 其他疾病。MSCs-EVs在许多疾病模型中显示出与MSCs相同的作用, 且MSCs-EVs相比于MSC具有易于保存和更高的安全性等优势, 因此, MSCs-EVs可以作为MSCs的替代物或有效成分用于疾病治疗。一些研究发现, 通过MSCs疗法可以改善阿尔茨海默病, 而且事实证明miR-146a在其中起着重要作用^[75,76]。因此, 值得进一步探讨MSCs-EVs是否包含这种miRNA, 以及MSCs-EVs是否可以替代干细胞以影响脑退行性疾病^[77]。移植物抗宿主病是用MSCs治疗的首批疾病之一, 近年来有研究发现, MSCs-EVs中表达的miRNA可以改善移植物抗宿主病^[78]。综上所述, MSCs-EVs中表达的miRNA在多种疾病中具有治疗作用, 但是MSCs-EVs移植到体内并发挥治疗作用的有效性需要进一步的研究, 对于作用疾病部位的特异性也需要进一步探究。

3.2 MSCs-EVs通过非miRNA途径在疾病治疗中的应用与研究进展

MSCs的旁分泌作用除了会产生miRNA以外还会产生修复性肽/蛋白质, mRNA并释放出相邻细胞间作用的生长因子、趋化因子和细胞因子^[26]. MSCs分泌的这些具有生物活性的因子对不同疾病具有治疗效果, 包括神经疾病、肝损伤、急性肾功能衰竭^[30]. 本文总结了MSCs-EVs通过非miRNA途径在上述疾病治疗中的应用(表4).

(1) MSCs-EVs在肾脏疾病中的应用与研究. 很多研究证明, MSCs-EVs在肾脏损伤模型中具有保护肾脏的作用. MSCs-EVs可以通过诱导肾小管细胞增殖, 加速重症联合免疫缺陷(severe combined immunodeficiency, SCID)小鼠中因甘油诱导的急性肾损伤(acute kidney injury, AKI)的形态和功能恢复^[79]. 在IRI大鼠

模型中, MSCs-EVs可以通过抑制细胞凋亡和刺激肾小管上皮细胞增殖而保护大鼠免受AKI侵害, MSCs-EVs还显著降低了肾功能的损害, 而且MSCs-EVs也可以保护大鼠免受后期慢性肾脏疾病的侵害^[80]. MSCs-EVs可以减少肾损伤后24 h的细胞凋亡并增强增殖, 同时改善肾功能并且减轻组织学损害, 而且MSCs-EVs可以上调肾VEGF的表达, 下调HIF-1 α 的表达, 达到促进血管生成的效果^[81]. MSCs-EVs也通过抗炎作用进而对肾脏进行保护, 在IRI大鼠模型中发现, 注射MSCs-EVs减少了受损肾脏中巨噬细胞的数量, 并且抑制了CX3CL1的表达^[82].

综上所述, MSCs-EVs对于肾脏疾病的作用主要是通过抑制细胞凋亡, 诱导肾小管细胞增殖, 促进血管生成以及抗炎作用从而对肾脏起到保护以及减少受损的作用.

(2) MSCs-EVs在肝脏疾病中的应用与研究. 许多

表 4 MSCs-EVs通过非miRNA途径在各种疾病中的应用与研究

Table 4 Application and research of MSCs-EVs in various diseases through non-miRNA pathways

MSCs来源	分离方法	疾病	动物模型	作用结果	参考文献
人骨髓	超速离心法	肾脏疾病	SCID小鼠中由甘油诱导的AKI模型	诱导肾小管细胞增殖, 加速SCID小鼠中甘油诱导的AKI形态和功能恢复	[79]
人骨髓	超速离心法		IRI大鼠模型	抑制细胞凋亡和刺激肾小管上皮细胞增殖而保护大鼠免受AKI侵害	[80]
人脐带血	超速离心法		IRI大鼠模型	减少肾损伤后24 h的细胞凋亡并增强增殖, 同时改善肾功能并且减轻组织学损害	[81]
人脐带血	超速离心法		IRI大鼠模型	减少受损肾脏中巨噬细胞的数量, 并且抑制CX3CL1的表达	[82]
人脐带血	密度梯度离心法	肝脏疾病	四氯化碳(CCl ₄)诱导的肝纤维化小鼠模型	减少表面纤维囊并减轻肝脏炎症和四氯化碳诱导的肝纤维化	[83]
鼠骨髓	超速离心法		伴刀豆球蛋白A诱导的肝损伤模型	降低血清丙氨酸转氨酶(ALT)的水平, 并且降低促炎细胞因子的产生, 升高抗炎细胞因子和调节性T细胞的水平	[84]
鼠骨髓	超速离心法		D-半乳糖苷/TNF- α 致死的小鼠肝衰竭致死模型	减少D-半乳糖苷/TNF- α 引起的肝炎和体内肝细胞损伤, 通过调节炎症反应和激活抗凋亡途径减轻肝损伤并提高存活率	[85]
人骨髓	商业试剂盒	神经系统	小鼠中风模型	诱导长期的神经保护, 并且改善神经系统的恢复, 增加神经发生和血管生成, 同时也调节缺血后的免疫反应	[86]
人骨髓	超速离心法		大鼠早发性脑损伤模型	改善炎症引起的神经元细胞变性, 减少小胶质细胞增生, 并且抑制反应性星形胶质增生	[87]
鼠骨髓	商业试剂盒		TBI模型	增加血管生成和神经发生, 减少神经炎症, 增强新生血管内皮细胞和新形成的不成熟和成熟神经元, 从而改善TBI后的功能恢复	[88]
人骨髓	色谱分离		TBI模型	抑制TBI后的神经炎症, 并且挽救模式分离和空间学习障碍	[89]

研究证明, MSCs-EVs在肝脏疾病中也有治疗作用. MSCs-EVs可以在四氯化碳(CCl_4)诱导的肝纤维化小鼠模型中减少表面纤维囊, 并减轻肝脏炎症和四氯化碳诱导的肝纤维化. MSCs-EVs在体内显著恢复血清中天氨酸转氨酶的活性, 降低I型和III型胶原蛋白, 以及降低TGF- β 1和磷酸化Smad2的表达, 同时致使上皮-间充质转化(epithelial-to-mesenchymal transition, EMT)的标志物E-钙黏蛋白阳性细胞增加, N-钙黏蛋白和波形蛋白阳性细胞减少^[83]. 在伴刀豆球蛋白A诱导的肝损伤模型中, MSCs-EVs降低了血清丙氨酸转氨酶(alanine aminotransferase, ALT)的水平, 并且降低了促炎细胞因子的产生, 升高了抗炎细胞因子和调节性T细胞的水平^[84]. 在D-半乳糖苷/TNF- α 致死的小鼠肝衰竭致死模型中, MSCs-EVs可以减少D-半乳糖苷/TNF- α 引起的肝炎症和体内肝细胞损伤, 通过调节炎症反应和激活抗凋亡途径减轻肝损伤并提高存活率, 同时MSCs-EVs携带的Y-RNA-1对肝细胞死亡具有保护作用^[85].

综上所述, MSCs-EVs通过调节体内酶的活性(丙氨酸转氨酶、天氨酸转氨酶等)以及抗炎因子和T细胞的水平而调节炎症反应和激活抗凋亡途径, 从而达到保护肝细胞的治疗效果.

(3) MSCs-EVs在神经系统疾病中的应用与研究. MSCs-EVs在治疗神经系统疾病方面具有很大的潜力. 在小鼠中风模型中, MSCs-EVs诱导产生了长期的神经保护, 并且改善了神经系统的恢复, 增加了神经发生和血管生成, 同时也调节了缺血后的免疫反应^[86]. 在大鼠早发性脑损伤模型中, MSCs-EVs改善了炎症引起的神经元细胞变性, 减少了小胶质细胞增生, 并且抑制了反应性星形胶质增生^[87]. 在创伤性脑损伤(trumatic brain injury, TBI)模型中, MSCs-EVs可以促进血管生成和神经发生, 减少神经炎症, 增强新生血管内皮细胞和新形成的不成熟和成熟神经元, 从

而改善TBI后的功能恢复^[88]. MSCs-EVs也可以抑制TBI后的神经炎症, 并且挽救模式分离和空间学习障碍^[89].

上述的研究表明, MSCs-EVs通过增加神经发生和促进血管生成而抑制神经系统疾病所导致的神经炎症以及免疫反应, 达到保护神经系统的治疗效果.

4 总结和展望

MSCs-EVs具有比MSC更安全、更直接、更有效的优势, 可以生产大量对多种疾病具有优异治疗效果的药物. 随着对MSCs-EVs的深入研究, 人们发现MSCs-EVs表达的miRNA起着重要作用. 综上所述, MSCs-EVs中的miRNA对炎症、创伤、变性疾病和肿瘤具有重要影响. 不仅如此, MSCs-EVs所含有的mRNA、细胞因子、趋化因子、免疫调节因子等生物活性分子在肾脏、肝脏、神经系统等疾病中也有重要的作用.

MSCs-EVs的治疗潜力使其在当前得到广泛的研究, 然而对于MSCs-EVs发挥作用的具体机制和成分暂未明确, 因此需要研究是MSCs-EVs中的哪些成分发挥至关重要的作用, 其具体机制也值得深入探讨. 与MSCs相比, MSCs来源的EVs在损伤修复和疾病治疗中的优点是从细胞疗法到无细胞疗法的转变, 其主要的局限性在于从MSCs中分离出EVs缺乏标准化的方法与流程. MSCs-EVs的分离以及纯化具有高度可变性, 因此也限制了MSCs-EVs不能通过工程技术进行大量分离, 其副作用在于MSCs-EVs在分离过程中可能受到污染导致其在损伤修复以及疾病治疗中发挥的作用出现偏差. 对MSCs-EVs的作用机制和成分以及MSCs-EVs的分离和纯化策略阐明后, 就能将MSCs-EVs进一步投入到疾病的研究中, 利用MSCs-EVs的靶向治疗作用, 实现对相应疾病的治疗.

参考文献

- 1 Wang Y, Han Z B, Ma J, et al. A toxicity study of multiple-administration human umbilical cord mesenchymal stem cells in cynomolgus monkeys. *Stem Cells Dev*, 2012, 21: 1401–1408
- 2 Ullah I, Subbarao R B, Rho G J. Human mesenchymal stem cells—current trends and future prospective. *Biosci Rep*, 2015, 35
- 3 Netter F H. Musculoskeletal System: Anatomy, Physiology, and Metabolic Disorders. New Jersey: Ciba-Geigy Corporation, 1987. 134
- 4 Brighton C T, Hunt R M. Early histological and ultrastructural changes in medullary fracture callus. *J Bone Joint Surg*, 1991, 73: 832–847

- 5 Pittenger M F, Mackay A M, Beck S C, et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science*, 1999, 284: 143–147
- 6 Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*, 2006, 8: 315–317
- 7 Mishra V K, Shih H H, Parveen F, et al. Identifying the therapeutic significance of mesenchymal stem cells. *Cells*, 2020, 9: 1145
- 8 Castro-Manreza M E, Montesinos J J. Immunoregulation by mesenchymal stem cells: biological aspects and clinical applications. *J Immunol Res*, 2015, 2015: 1–20
- 9 Pereira R F, Halford K W, O'Hara M D, et al. Cultured adherent cells from marrow can serve as long-lasting precursor cells for bone, cartilage, and lung in irradiated mice. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1995, 92: 4857–4861
- 10 Schwartz R E, Reyes M, Koodie L, et al. Multipotent adult progenitor cells from bone marrow differentiate into functional hepatocyte-like cells. *J Clin Invest*, 2002, 109: 1291–1302
- 11 Dai W, Hale S L, Martin B J, et al. Allogeneic mesenchymal stem cell transplantation in postinfarcted rat myocardium. *Circulation*, 2005, 112: 214–223
- 12 Golpanian S, Wolf A, Hatzistergos K E, et al. Rebuilding the damaged heart: mesenchymal stem cells, cell-based therapy, and engineered heart tissue. *Physiol Rev*, 2016, 96: 1127–1168
- 13 Bae J S, Han H S, Youn D H, et al. Bone marrow-derived mesenchymal stem cells promote neuronal networks with functional synaptic transmission after transplantation into mice with neurodegeneration. *Stem Cells*, 2007, 25: 1307–1316
- 14 Tan K, Zheng K, Li D, et al. Impact of adipose tissue or umbilical cord derived mesenchymal stem cells on the immunogenicity of human cord blood derived endothelial progenitor cells. *PLoS ONE*, 2017, 12: e0178624
- 15 Ulivi V, Tasso R, Cancedda R, et al. Mesenchymal stem cell paracrine activity is modulated by platelet lysate: Induction of an inflammatory response and secretion of factors maintaining macrophages in a proinflammatory phenotype. *Stem Cells Dev*, 2014, 23: 1858–1869
- 16 Bollini S, Gentili C, Tasso R, et al. The regenerative role of the fetal and adult stem cell secretome. *J Clin Med*, 2013, 2: 302–327
- 17 Ratajczak M Z, Kucia M, Jadczyk T, et al. Pivotal role of paracrine effects in stem cell therapies in regenerative medicine: Can we translate stem cell-secreted paracrine factors and microvesicles into better therapeutic strategies? *Leukemia*, 2012, 26: 1166–1173
- 18 Liang X, Ding Y, Zhang Y, et al. Paracrine mechanisms of mesenchymal stem cell-based therapy: current status and perspectives. *Cell Transplant*, 2014, 23: 1045–1059
- 19 Gneocchi M, He H, Liang O D, et al. Paracrine action accounts for marked protection of ischemic heart by Akt-modified mesenchymal stem cells. *Nat Med*, 2005, 11: 367–368
- 20 Lee C, Mitsialis S A, Aslam M, et al. Exosomes mediate the cytoprotective action of mesenchymal stromal cells on hypoxia-induced pulmonary hypertension. *Circulation*, 2012, 126: 2601–2611
- 21 Zhang B, Yin Y, Lai R C, et al. Mesenchymal stem cells secrete immunologically active exosomes. *Stem Cells Dev*, 2014, 23: 1233–1244
- 22 Fan X L, Zhang Y, Li X, et al. Mechanisms underlying the protective effects of mesenchymal stem cell-based therapy. *Cell Mol Life Sci*, 2020, 77: 2771–2794
- 23 Lötvall J, Hill A F, Hochberg F, et al. Minimal experimental requirements for definition of extracellular vesicles and their functions: a position statement from the International Society for Extracellular Vesicles. *J Extracell Vesicles*, 2014, 3: 26913
- 24 Rani S, Ryan A E, Griffin M D, et al. Mesenchymal stem cell-derived extracellular vesicles: toward cell-free therapeutic applications. *Mol Ther*, 2015, 23: 812–823
- 25 Quesenberry P J, Goldberg L R, Aliotta J M, et al. Cellular phenotype and extracellular vesicles: basic and clinical considerations. *Stem Cells Dev*, 2014, 23: 1429–1436
- 26 Haynesworth S E, Baber M A, Caplan A I. Cytokine expression by human marrow-derived mesenchymal progenitor cells *in vitro*: Effects of dexamethasone and IL-1 α . *J Cell Physiol*, 1996, 166: 585–592
- 27 Caplan A I, Dennis J E. Mesenchymal stem cells as trophic mediators. *J Cell Biochem*, 2006, 98: 1076–1084
- 28 Teixeira F G, Carvalho M M, Sousa N, et al. Mesenchymal stem cells secretome: a new paradigm for central nervous system regeneration? *Cell Mol Life Sci*, 2013, 70: 3871–3882
- 29 Moravej A, Karimi M H, Geramizadeh B, et al. Mesenchymal stem cells upregulate the expression of PD-L1 but not VDR in dendritic cells. *Immunol Invest*, 2017, 46: 80–96
- 30 Merino-González C, Zuñiga F A, Escudero C, et al. Mesenchymal stem cell-derived extracellular vesicles promote angiogenesis: potencial

- clinical application. *Front Physiol*, 2016, 7
- 31 Liu H, Chen Y, Yin G, et al. Therapeutic prospects of microRNAs carried by mesenchymal stem cells-derived extracellular vesicles in autoimmune diseases. *Life Sci*, 2021, 277: 119458
- 32 Goichberg P. Current understanding of the pathways involved in adult stem and progenitor cell migration for tissue homeostasis and repair. *Stem Cell Rev Rep*, 2016, 12: 421–437
- 33 Ren W, Hou J, Yang C, et al. Extracellular vesicles secreted by hypoxia pre-challenged mesenchymal stem cells promote non-small cell lung cancer cell growth and mobility as well as macrophage M2 polarization via miR-21-5p delivery. *J Exp Clin Cancer Res*, 2019, 38: 62
- 34 Qiu G, Zheng G, Ge M, et al. Functional proteins of mesenchymal stem cell-derived extracellular vesicles. *Stem Cell Res Ther*, 2019, 10: 359
- 35 Colombo M, Moita C, van Niel G, et al. Analysis of ESCRT functions in exosome biogenesis, composition and secretion highlights the heterogeneity of extracellular vesicles. *J Cell Sci*, 2013, 126: 5553–5565
- 36 Kim H S, Choi D Y, Yun S J, et al. Proteomic analysis of microvesicles derived from human mesenchymal stem cells. *J Proteome Res*, 2012, 11: 839–849
- 37 Angulski A B B, Capriglione L G, Batista M, et al. The protein content of extracellular vesicles derived from expanded human umbilical cord blood-derived CD133⁺ and human bone marrow-derived mesenchymal stem cells partially explains why both sources are advantageous for regenerative medicine. *Stem Cell Rev Rep*, 2017, 13: 244–257
- 38 Anderson J D, Johansson H J, Graham C S, et al. Comprehensive proteomic analysis of mesenchymal stem cell exosomes reveals modulation of angiogenesis via nuclear factor-KappaB signaling. *Stem Cells*, 2016, 34: 601–613
- 39 Wahid F, Shehzad A, Khan T, et al. MicroRNAs: Synthesis, mechanism, function, and recent clinical trials. *Biochim Biophys Acta*, 2010, 1803: 1231–1243
- 40 Ferguson S W, Wang J, Lee C J, et al. The microRNA regulatory landscape of MSC-derived exosomes: a systems view. *Sci Rep*, 2018, 8: 1419
- 41 Baglio S R, Rooijers K, Koppers-Lalic D, et al. Human bone marrow- and adipose-mesenchymal stem cells secrete exosomes enriched in distinctive miRNA and tRNA species. *Stem Cell Res Ther*, 2015, 6: 127
- 42 Muller L, Hong C S, Stolz D B, et al. Isolation of biologically-active exosomes from human plasma. *J Immunol Methods*, 2014, 411: 55–65
- 43 Hiemstra T F, Charles P D, Gracia T, et al. Human urinary exosomes as innate immune effectors. *J Am Soc Nephrol*, 2014, 25: 2017–2027
- 44 Théry C, Amigorena S, Raposo G, et al. Isolation and characterization of exosomes from cell culture supernatants and biological fluids. *Curr Protoc Cell Biol*, 2006, 3: 22
- 45 Lässer C, Eldh M, Lötvall J. Isolation and characterization of RNA-containing exosomes. *J Vis Exp*, 2012, 59
- 46 Nocera A L, Miyake M M, Seifert P, et al. Exosomes mediate interepithelial transfer of functional P-glycoprotein in chronic rhinosinusitis with nasal polyps. *Laryngoscope*, 2017, 127: E295–E300
- 47 Zhang M, Jin K, Gao L, et al. Methods and technologies for exosome isolation and characterization. *Small Methods*, 2018, 2: 1800021
- 48 Cvjetkovic A, Lötvall J, Lässer C. The influence of rotor type and centrifugation time on the yield and purity of extracellular vesicles. *J Extracell Vesicles*, 2014, 3: 23111
- 49 Zaborowski M L P, Balaj L, Breakefield X O, et al. Extracellular vesicles: composition, biological relevance, and methods of study. *Bioscience*, 2015, 65: 783–797
- 50 Liga A, Vliegenthart A D B, Oosthuizen W, et al. Exosome isolation: a microfluidic road-map. *Lab Chip*, 2015, 15: 2388–2394
- 51 Tauro B J, Greening D W, Mathias R A, et al. Comparison of ultracentrifugation, density gradient separation, and immunoaffinity capture methods for isolating human colon cancer cell line LIM1863-derived exosomes. *Methods*, 2012, 56: 293–304
- 52 Li P, Kaslan M, Lee S H, et al. Progress in exosome isolation techniques. *Theranostics*, 2017, 7: 789–804
- 53 Anderson N G. An introduction to particle separations in zonal centrifuges. *Natl Cancer Inst Monogr*, 1966, 21: 9–39
- 54 Böing A N, van der Pol E, Grootemaat A E, et al. Single-step isolation of extracellular vesicles by size-exclusion chromatography. *J Extracell Vesicles*, 2014, 3: 23430
- 55 Gheinani A H, Vögeli M, Baumgartner U, et al. Improved isolation strategies to increase the yield and purity of human urinary exosomes for biomarker discovery. *Sci Rep*, 2018, 8: 3945
- 56 Lozano-Ramos I, Bancu I, Oliveira-Tercero A, et al. Size-exclusion chromatography-based enrichment of extracellular vesicles from urine samples. *J Extracell Vesicles*, 2015, 4: 27369
- 57 Sódar B W, Kittel Á, Pálóczi K, et al. Low-density lipoprotein mimics blood plasma-derived exosomes and microvesicles during isolation and

- detection. *Sci Rep*, 2016, 6: 24316
- 58 Ueda K, Ishikawa N, Tatsuguchi A, et al. Antibody-coupled monolithic silica microtips for highthroughput molecular profiling of circulating exosomes. *Sci Rep*, 2015, 4: 6232
- 59 Clayton A, Court J, Navabi H, et al. Analysis of antigen presenting cell derived exosomes, based on immuno-magnetic isolation and flow cytometry. *J Immunol Methods*, 2001, 247: 163–174
- 60 du Cheyron D, Daubin C, Poggioli J, et al. Urinary measurement of Na^+/H^+ exchanger isoform 3 (NHE3) protein as new marker of tubule injury in critically ill patients with ARF. *Am J Kidney Dis*, 2003, 42: 497–506
- 61 Konoshenko M Y, Lekchnov E A, Vlassov A V, et al. Isolation of extracellular vesicles: general methodologies and latest trends. *Biomed Res Int*, 2018, 2018: 1–27
- 62 Helwa I, Cai J, Drewry M D, et al. A comparative study of serum exosome isolation using differential ultracentrifugation and three commercial reagents. *PLoS ONE*, 2017, 12: e0170628
- 63 Rekker K, Saare M, Roost A M, et al. Comparison of serum exosome isolation methods for microRNA profiling. *Clin Biochem*, 2014, 47: 135–138
- 64 Schageman J, Zeringer E, Li M, et al. The complete exosome workflow solution: from isolation to characterization of RNA cargo. *Biomed Res Int*, 2013, 2013: 1–15
- 65 Fang S B, Zhang H Y, Wang C, et al. Small extracellular vesicles derived from human mesenchymal stromal cells prevent group 2 innate lymphoid cell-dominant allergic airway inflammation through delivery of miR-146a-5p. *J Extracell Vesicles*, 2020, 9: 1723260
- 66 Zhao J, Li X, Hu J, et al. Mesenchymal stromal cell-derived exosomes attenuate myocardial ischaemia-reperfusion injury through miR-182-regulated macrophage polarization. *Cardiovasc Res*, 2019, 115: 1205–1216
- 67 Wen Z, Mai Z, Zhu X, et al. Mesenchymal stem cell-derived exosomes ameliorate cardiomyocyte apoptosis in hypoxic conditions through microRNA144 by targeting the PTEN/AKT pathway. *Stem Cell Res Ther*, 2020, 11: 36
- 68 Cao H, Cheng Y, Gao H, et al. *In vivo* tracking of mesenchymal stem cell-derived extracellular vesicles improving mitochondrial function in renal ischemia-reperfusion injury. *ACS Nano*, 2020, 14: 4014–4026
- 69 Qin F, Tang H, Zhang Y, et al. Bone marrow-derived mesenchymal stem cell-derived exosomal microRNA-208a promotes osteosarcoma cell proliferation, migration, and invasion. *J Cell Physiol*, 2020, 235: 4734–4745
- 70 Liang B, Liang J M, Ding J N, et al. Dimethylxaloylglycine-stimulated human bone marrow mesenchymal stem cell-derived exosomes enhance bone regeneration through angiogenesis by targeting the AKT/mTOR pathway. *Stem Cell Res Ther*, 2019, 10: 335
- 71 Gopalan V, Ebrahimi F, Islam F, et al. Tumour suppressor properties of miR-15a and its regulatory effects on BCL2 and SOX2 proteins in colorectal carcinomas. *Exp Cell Res*, 2018, 370: 245–253
- 72 Ono M, Kosaka N, Tominaga N, et al. Exosomes from bone marrow mesenchymal stem cells contain a microRNA that promotes dormancy in metastatic breast cancer cells. *Sci Signal*, 2014, 7: ra63
- 73 Lou G, Song X, Yang F, et al. Exosomes derived from miR-122-modified adipose tissue-derived MSCs increase chemosensitivity of hepatocellular carcinoma. *J Hematol Oncol*, 2015, 8: 122
- 74 Losurdo M, Pedrazzoli M, D'Agostino C, et al. Intranasal delivery of mesenchymal stem cell-derived extracellular vesicles exerts immunomodulatory and neuroprotective effects in a 3xTg model of Alzheimer's disease. *Stem Cells Transl Med*, 2020, 9: 1068–1084
- 75 Katsuda T, Oki K, Ochiya T. Potential application of extracellular vesicles of human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells in Alzheimer's disease therapeutics. In: Turksen K, ed. *Stem Cell Renewal and Cell-Cell Communication. Methods in Molecular Biology*. New York: Humana Press, 2014. 171–181
- 76 Wan F Z, Chen K H, Sun Y C, et al. Exosomes overexpressing miR-34c inhibit malignant behavior and reverse the radioresistance of nasopharyngeal carcinoma. *J Transl Med*, 2020, 18: 12
- 77 Nakano M, Kubota K, Kobayashi E, et al. Bone marrow-derived mesenchymal stem cells improve cognitive impairment in an Alzheimer's disease model by increasing the expression of microRNA-146a in hippocampus. *Sci Rep*, 2020, 10: 10772
- 78 Fujii S, Miura Y, Fujishiro A, et al. Graft-versus-host disease amelioration by human bone marrow mesenchymal stromal/stem cell-derived extracellular vesicles is associated with peripheral preservation of naive T cell populations. *Stem Cells*, 2018, 36: 434–445
- 79 Bruno S, Grange C, Deregibus M C, et al. Mesenchymal stem cell-derived microvesicles protect against acute tubular injury. *J Am Soc Nephrol*, 2009, 20: 1053–1067

- 80 Gatti S, Bruno S, Deregibus M C, et al. Microvesicles derived from human adult mesenchymal stem cells protect against ischaemia-reperfusion-induced acute and chronic kidney injury. *Nephrol Dial Transplant*, 2011, 26: 1474–1483
- 81 Zou X, Gu D, Xing X, et al. Human mesenchymal stromal cell-derived extracellular vesicles alleviate renal ischemic reperfusion injury and enhance angiogenesis in rats. *Am J Transl Res*, 2016, 8: 4289–4299
- 82 Zou X, Zhang G, Cheng Z, et al. Microvesicles derived from human Wharton's Jelly mesenchymal stromal cells ameliorate renal ischemia-reperfusion injury in rats by suppressing CX3CL1. *Stem Cell Res Ther*, 2014, 5: 40
- 83 Li T, Yan Y, Wang B, et al. Exosomes derived from human umbilical cord mesenchymal stem cells alleviate liver fibrosis. *Stem Cells Dev*, 2013, 22: 845–854
- 84 Tamura R, Uemoto S, Tabata Y. Immunosuppressive effect of mesenchymal stem cell-derived exosomes on a concanavalin A-induced liver injury model. *Inflamm Regen*, 2016, 36: 26
- 85 Haga H, Yan I K, Takahashi K, et al. Extracellular vesicles from bone marrow-derived mesenchymal stem cells improve survival from lethal hepatic failure in mice. *Stem Cells Transl Med*, 2017, 6: 1262–1272
- 86 Doeppner T R, Herz J, Görgens A, et al. Extracellular vesicles improve post-stroke neuroregeneration and prevent postischemic immunosuppression. *Stem Cells Transl Med*, 2015, 4: 1131–1143
- 87 Drommelschmidt K, Serdar M, Bendix I, et al. Mesenchymal stem cell-derived extracellular vesicles ameliorate inflammation-induced preterm brain injury. *Brain Behav Immun*, 2017, 60: 220–232
- 88 Zhang Y, Chopp M, Meng Y, et al. Effect of exosomes derived from multipotential mesenchymal stromal cells on functional recovery and neurovascular plasticity in rats after traumatic brain injury. *J Neurosurg*, 2015, 122: 856–867
- 89 Kim D, Nishida H, An S Y, et al. Chromatographically isolated CD63⁺ CD81⁺ extracellular vesicles from mesenchymal stromal cells rescue cognitive impairments after TBI. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2016, 113: 170–175

Novel development of mesenchymal stem cells-derived extracellular vesicles in regenerative medicine and disease therapeutics

GU Zeng^{1,2}, LIANG ShengXian^{1,2}, LIU DongXue^{1,2}, GUO Rui^{1,2} & ZHONG Li^{1,2}

1 School of Life Sciences, Hebei University, Baoding 071002, China;

2 Institute of Life Sciences and Green Development, Hebei University, Baoding 071002, China

Mesenchymal stem cells (MSCs), as adult stem cells, have the inherent proliferation and differentiation abilities as regular stem cells and powerful immune regulatory functions. Thus, MSCs have been used in broad applications in regenerative medicine and treatments for clinical inflammatory diseases. In recent studies, much evidence has shown that the mechanism of MSCs is mainly through the enhanced paracrine activity to secrete extracellular vesicles (EVs). Mesenchymal stem cells-derived EVs (MSCs-EVs) have the biological characteristics of parental cells and significant therapeutic effects shown in many preclinical disease models. MSCs-EVs can lead to the enriched expression of various microRNAs, which can affect angiogenesis, cell growth, and apoptosis, and other related biological functions. Additionally, EVs contain MSCs-derived mRNA, cytokines, chemokines, immunomodulators, and other biologically active molecules. These factors play important roles in the regeneration of tissue injuries and disease treatments. This review summarizes the latest applications and research progresses of MSCs-EVs and provides comprehensive information for the in-depth understanding of the mechanisms of MSCs-EVs in clinical applications.

mesenchymal stem cells, extracellular vesicles, tissue repair, regenerative medicine, microRNA

doi: [10.1360/SSV-2021-0219](https://doi.org/10.1360/SSV-2021-0219)