



细胞外囊泡参与氧化平衡在衰老和再生过程中的研究进展

黄炜明¹, 汪瑞昕¹, 张夏茵¹, 王婷¹, 林浩添^{1,2,3*}

1. 中山大学中山眼科中心, 眼科学国家重点实验室, 广州 510060;

2. 中山大学中山眼科中心海南眼科医院, 海南省眼科学重点实验室, 海口 570311;

3. 中山大学精准医学科学中心, 广州 510080

* 联系人, E-mail: linht5@mail.sysu.edu.cn

收稿日期: 2022-04-26; 接受日期: 2022-05-11; 网络版发表日期: 2022-07-05

国家自然科学基金(批准号: 82171035)资助

摘要 细胞外囊泡(extracellular vesicles, EVs)是细胞间通讯的媒介, 参与众多生理和病理过程的调节, 同时也是极富潜力的生物标记物和治疗工具. 然而在应用于临床之前, 仍需要更深入地研究其相关作用的分子机制. 氧化还原体系的平衡既与衰老性疾病的发生和进展相关, 又参与了损伤后修复和组织再生等过程的调节, 是老化与再生的中心环节之一. EVs的发生以及其所携带的活性生物成分都具有衰老、再生、氧化应激敏感性, 其含量或成分的改变可以触发靶细胞中的抗氧化剂和促氧化剂的反应, 从而调节氧化还原平衡状态. 本文总结了目前EVs研究领域的相关共识, 综述了EVs参与氧化还原平衡调节在衰老和再生相关病理过程的相关研究, 并讨论了EVs未来临床应用的方向和前景.

关键词 细胞外囊泡, 氧化还原, 衰老性疾病, 再生

氧化还原体系是衰老与再生的中心环节之一, 然而其调节二者平衡的具体机制尚不清楚. 随着现代科学对细胞外囊泡(extracellular vesicles, EVs)的研究不断深入, 科学家们逐渐意识到其在物质运输、信号通讯方面的功能, 在组织再生、器官退化等生命过程中的重要地位, 以及其具备的特异性复杂生物学反应能力和工程化应用潜能. 因此, 对细胞外囊泡与细胞氧化还原平衡之间相互作用的深入研究可能为解释衰老和再生的作用机制开辟新的途径, 有望成为衰老性疾病和再生治疗的有力工具. 本文将对目前相关领域的

研究进行综述.

1 细胞外囊泡的基本生物性质

EVs是指一系列具有异质性膜结构的囊泡, 主要包括外泌体(exosomes)、微囊泡(microvesicles, MVs)和凋亡小体(apoptotic bodies)等. 它们分别来自核内体系统或直接从细胞质膜上形成^[1]. 在最早期的相关研究里, 研究者认为EVs是成熟绵羊网织红细胞丢弃多余细胞成分的小泡^[2]. 然而经过后续深入的研究发现,

引用格式: 黄炜明, 汪瑞昕, 张夏茵, 等. 细胞外囊泡参与氧化平衡在衰老和再生过程中的研究进展. 中国科学: 生命科学, 2022, 52: 974–987
Huang W M, Wang R X, Zhang X Y, et al. Research progress in extracellular vesicles involved in redox balance during aging and regeneration (in Chinese). Sci Sin Vitae, 2022, 52: 974–987, doi: 10.1360/SSV-2021-0174

它们不仅广泛存在于各种体液中, 而且参与了多种生理和病理过程^[1,3-5]. 各种EVs均具有由脂质双分子层构成的膜结构, 以及与原核细胞的膜或外膜(来源于原核细胞)、真核细胞的质膜或核内体(来源于真核细胞)相似的膜蛋白, 在膜结构内部则包裹着来自于其来源细胞的内含物, 从细胞内被释放到细胞外环境中^[3,5] (图1). 外泌体是EVs中尺寸最小的一种, 直径大小从50到200 nm不等^[5-8]. 外泌体的膜结构具有异质性, 不同外泌体的膜结构有所不同, 可携带不同的物质和实现不同的功能^[9,10], 现在普遍认为外泌体是参与生理和病理过程的细胞间通信的中介^[11]. 外泌体由细胞内溶酶体微粒内陷形成多囊泡体, 然后经多囊泡体外膜与细胞膜融合而释放到胞外基质中^[1]. 区别于外泌体, 微囊泡则是直接从供体细胞的质膜上以出芽的方式形成, 其尺寸通常比外泌体更大, 一般在200 nm至几 μm 之间^[12], 微囊泡与外泌体一样也具有类似的亚型异质性^[9]. 外泌体和微囊泡之间最明显的区别是它们的生物发生方式不同^[12]. 细胞质或其他细胞器的任何特定成分是否融入EVs是由以下因素决定的: (i) 接近出芽膜的距离和EVs的大小(被动运输); (ii) 与膜的特定关联以及任何能量依赖过程(主动运输).

EVs可以携带多种特殊生物分子、功能蛋白和核酸等, 其内容物根据来源而各有不同^[13-16]. EVs的产生和分布十分广泛, 几乎所有类型的细胞都会释放EVs^[17,18], 在血液^[19]、尿液^[20]、脑脊液^[21]等多种体液中也都能检测到. EVs主要通过质膜融合释放^[22], 释放后, 可以旁分泌作用于分泌细胞附近的特定靶细胞, 也可进入体液到达远离分泌细胞的靶细胞, 类似于经典的内分泌过程^[13,15,23,24]. EVs可通过与靶细胞膜受体的相互作用, 引发信号激活, 并向细胞内部释放其生物活性分子(如蛋白质、核酸等), 或通过胞吞作用直接进入靶细胞. EVs通过携带特定生物活性分子实现不同的功能, 介导多种生理过程^[4,7,25,26]. 例如, 间充质干细胞(mesenchymal stem/stromal cells, MSCs)分泌的EVs可携带多种miRNA, 通过将miRNA转移到肾小管上皮细胞中, 激活其抗凋亡和再生程序, 促进急性肾损伤的恢复^[27]; 抗原呈递细胞分泌的EVs携带完整抗原和MHC-肽复合物, 可激活CD4⁺和CD8⁺ T细胞, 从而启动免疫反应^[28]; 缺氧的胶质母细胞瘤细胞通过分泌带有组织因子和凝血因子VIIa的EVs, 激活内皮细胞的PAR-2信号传导, 导致促血管生成的生长因子HB-EGF

水平升高, 继而促进血管的形成^[26]; 败血症血小板来源的EVs携带NADPH氧化酶和NO合酶II, 可诱导内皮细胞caspase-3的激活和细胞凋亡^[29]等. 除此以外, EVs还可以通过在其膜结构表面表达的配体直接激活靶细胞. 例如, 源自树突状细胞的抗原呈递EVs在体内引起T细胞介导的免疫反应^[17,30].

EVs特殊的生物性质, 使其在诸如发育、免疫调节、癌症以及病毒和朊病毒的传播等方面^[31-39], 可扮演多种不同的角色. 除正常的生理功能外, EVs也被广泛报道与缺氧相关的多种疾病^[25,40-43]以及衰老中的氧化还原调节等病理或生理过程相关^[44].

2 氧化与抗氧化调节是衰老和再生的关键

正常情况下, 机体的氧化与抗氧化处于一种动态的平衡之中, 但当各种原因引起抗氧化防御系统受损, 将导致自由基水平明显升高, 从而引起氧化应激. 过量的自由基特别是活性氧自由基(reactive oxygen species, ROS), 可以攻击包括DNA在内的所有生物分子, 引起蛋白质的结构破坏或者功能改变、脂质过氧化、基因突变等多种不良后果^[45]. 氧化应激是引起衰老的主要机制之一. ROS的积累可能引起“线粒体恶性循环”, 对维持线粒体正常功能的mtDNA造成破坏, 线粒体是细胞进行有氧呼吸的关键细胞器, 其与ROS等自由基的产生和消除密切相关, 而mtDNA损伤积累将导致细胞衰老^[46]. 自由基还可间接诱导线粒体细胞色素C的释放, 最终导致细胞的凋亡^[47]. 自由基的毒性能造成广泛的细胞损伤, 例如自由基可引起脂质过氧化产生4-HNE, 后者很容易在膜结构上扩散, 可进一步诱导脂质的过氧化造成膜损伤, 引发线粒体的氧化损伤^[47]. 在老年性白内障患者的晶状体纤维^[48]、阿尔兹海默症(Alzheimer's disease, AD)和帕金森综合征(Parkinson's disease, PD)患者的脑细胞^[49,50]以及动脉粥样硬化的内皮细胞和巨噬细胞^[51]中均发现由自由基带来的不同程度的氧化应激损害.

由于ROS等自由基具有较高的反应活性, 因此具有多种毒性和有害作用, 为了对抗其损害, 细胞形成了完整的抗氧化机制以清除自由基^[52]. 这种抗氧化系统包括内源性和外源性两种, 而其中内源性抗氧化方式又分为酶促途径和非酶促途径^[53]. 酶促途径代表的抗氧化酶是超氧化物歧化酶(superoxide dismutases,

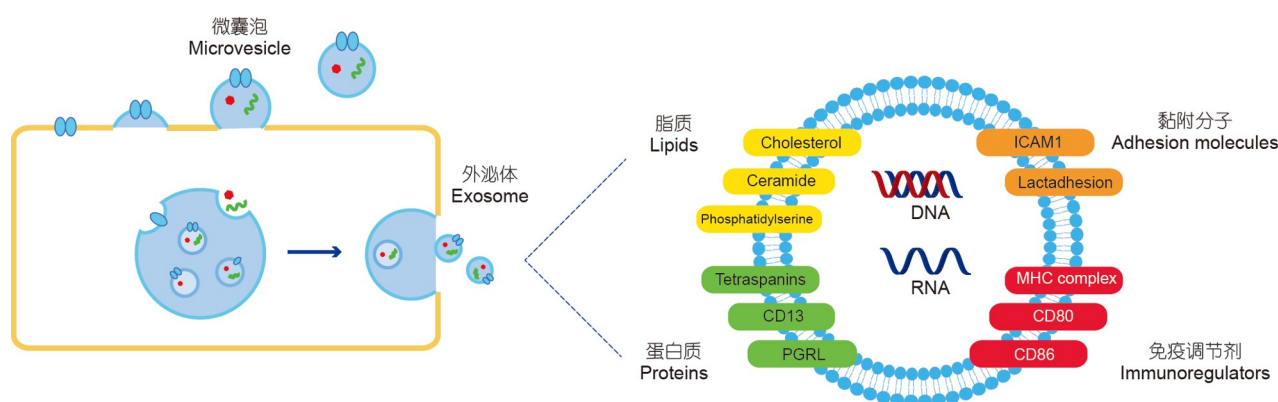


图1 微囊泡、外泌体的生物发生以及外泌体中常见的内容物

Figure 1 Microvesicles, exosome biogenesis, and common exosome contents

SOD)、过氧化氢酶(catalase, CAT)、谷胱甘肽过氧化物酶(glutathione peroxidase, GSH-Px)等^[54]; 非酶促途径由非酶类抗氧化剂与ROS相互作用并终止自由基的链式反应, 如胆红素、维生素E和β-胡萝卜素等^[55]; 外源性抗氧化剂主要包括维生素C和酚类抗氧化剂^[56]。由于内源性的ROS主要来源是细胞内腔室(线粒体、过氧化物酶体和内质网), 所以细胞内部比细胞外需要更强的抗氧化机制^[52]。

然而生理情况下, 所有需氧细胞均会产生ROS^[57], 正常的氧化还原系统维持着生命体的有序运作。低水平的ROS具有重要的生理意义^[58], ROS通过诱导氧化还原敏感信号级联反应, 增加抗氧化酶的表达, 提高抗氧化防御系统效力, 使细胞能存活于原本致命的氧化剂暴露环境之中^[59]。在运动过程中, 骨骼肌收缩会导致ROS的产生^[60], 适当水平的ROS可对肌肉力量产生积极的影响, 但当ROS浓度较高时则会对骨骼肌造成损伤^[61]。除此之外, ROS还参与破坏病原体^[62]、炎症^[63]以及控制血压^[64]等过程。中性粒细胞在识别并吞噬病原体后, 会引发“呼吸爆发”, 产生并释放出大量的ROS等物质, 而ROS可通过与酶、蛋白质、DNA以及细菌细胞膜中的硫醇基发生反应, 破坏其分子结构, 导致病原体的死亡^[62,65]。在炎症反应的发展过程中, ROS作为关键信号分子起重要作用。在炎症部位, 多核中性粒细胞(polymorphonuclear neutrophils, PMN)的ROS生成增强, 炎症条件下PMN引发的氧化应激可导致血管内皮间连接的开放, 促进炎症细胞穿过内皮屏障的迁移, 有助于清除病原体和外来颗粒^[63,65]。可见, 通过氧化还原体系调节ROS水平的高低具有重要的生理意义。

氧化调节在再生医学领域也引起了广泛关注, 研究人员发现, 在某些情况下, 氧化应激虽有所增加, 但寿命反而延长。在骨骼肌再生过程中, 相关细胞或分子层面的过程也受氧化还原体系的调节, ROS/RNS可靶向控制肌肉干细胞的细胞活动及其所处微环境(包括免疫细胞)的多种信号通路, 并在生理(运动引起的肌肉损伤、衰老)或病理(肌营养不良)情况起调控的作用^[66]。运动诱导的神经元干细胞的增殖和分化过程也需要依赖ROS参与调控。在激烈运动过程中, ROS诱导的相关抗氧化/修复过程、基本代谢功能系统的上调与生理功能的改善有关^[67]。在小鼠肌肉细胞和人非肌肉细胞中, 线粒体对Ca²⁺的吸收会引发ROS的生成, 从而激活肌动蛋白的聚合反应并闭合伤口。在运动的小鼠肌肉中, 线粒体产生的ROS淬灭会导致对肌纤维的更大损害并降低肌肉力量^[68]。综上所述, 氧平衡体系可能是调节衰老和再生的关键环节, 而氧化应激的效果是则一把双刃剑。

3 细胞外囊泡对自由基平衡体系的调节

EVs可根据其来源细胞和目标细胞的状态, 以及环境条件不同, 对自由基产生不同的影响^[69]。EVs与自由基密切相关, 不仅EVs能够参与产生自由基或清除自由基, 而且自由基也参与了EVs的产生。半胱氨酸的残基在蛋白质中提供了具有亲核性的硫醇基团, 容易受氧化还原修饰, 而自由基与抗氧化剂组成的氧化还原体系可通过对硫醇修饰的调节间接影响EVs的释放^[70]。肿瘤细胞^[43]和衰老细胞^[71]也产生数量较多的

EVs, 而且两种细胞都因ROS水平升高而改变了其氧化还原平衡^[53,72]. 除此之外, EVs还可以作为氧化应激后去除氧化蛋白的替代机制, 使其成为氧化应激的生物标志物^[69].

EVs可携带诸如谷胱甘肽过氧化物酶(glutathione peroxidase, GPX)、谷胱甘肽S-转移酶(glutathione S-transferase, GST)、过氧还蛋白(peroxiredoxin, PRDX)、SOD和CAT等多种参与自由基清除的抗氧化酶^[73], 在细胞外环境中作为自由基的清道夫^[52], 如氧化应激状态下的T淋巴细胞分泌的EVs携带多种与抗氧化防御相关的酶, 可保护其靶细胞免受氧化应激引起的凋亡^[74]. 然而, 除了抗氧化相关的物质外, 在EVs内也发现了与ROS的产生相关的NADPH氧化酶, 并且已有研究证明了其以NADPH氧化酶依赖的方式产生ROS^[75,76]. 当携带NADPH氧化酶等自由基合成相关酶的EVs与靶细胞结合时, 此时的EVs就成了自由基的生产者^[52], 如败血症血小板来源的EVs携带NADPH氧化酶和NO合酶II, 可诱导内皮细胞caspase-3的激活和细胞凋亡^[29].

除了对自由基的直接作用, 在生理条件下, EVs也可以通过间接作用对氧化还原体系产生影响. 前面提到EVs可以作为各种生物分子的运输载体, 可向靶细胞运输参与自由基产生或清除的酶成分, 调节细胞活动和/或参与氧化还原过程的基因表达的信号分子, 间接影响细胞内自由基的水平^[52]. 例如, 氧化应激状态下的T淋巴细胞分泌的EVs, 除前面提及可携带抗氧化酶外, 还可携带抗氧化酶的mRNA, 通过诱导内皮细胞抗氧化酶的表达, 以间接作用保护其免受氧化应激引起的凋亡^[74]. 缺氧诱导的心脏祖细胞分泌的EVs可携带诸如miR-199a, miR-17等调节心脏功能和修复相关的miRNA, 可减弱氧化应激诱导的caspase 3/7活化, 以间接作用抑制心肌细胞的凋亡和纤维化^[77]. 而氧化应激状态下活化的血小板分泌的EVs, 则可通过与其他血小板CD36的结合触发MKK4/JNK2信号传导并活化靶血小板, 且以CD36和磷脂酰丝氨酸依赖的方式增强血小板氧化应激^[78].

4 细胞外囊泡在氧化和衰老相关的疾病中的作用机制

如前所述, EVs与氧化还原体系在衰老相关的过

程中发挥着重要的作用. 而EVs的内含物组成是由其来源细胞的类型和生理状态所决定的, 因此EVs可在氧化相关的衰老过程相关疾病中以不同的机制产生作用.

阿尔兹海默症是一种与衰老相关的慢性神经退行性疾病, 其特征是记忆力下降和认知功能障碍. 目前人们普遍认为, 淀粉样蛋白 β (amyloid β , A β)的积累、持续的Tau蛋白超磷酸化、突触丢失、氧化应激和神经元死亡可能在AD的发病机制中起关键作用^[79]. EVs是中枢神经系统细胞间通信的重要载体, 可通过传递特定的信号分子, 激活多种信号通路, 从而改变靶细胞的表型和功能^[80]. 有研究发现, A β 可随着EVs从细胞中分泌, 并且在AD患者大脑的斑块中发现有EVs蛋白的积累^[81]. 除此之外, 前文也提到EVs与氧化应激有密切关系, 可见EVs在AD发病机制中可能起调节中介的作用.

帕金森综合征是第二大常见的与衰老相关的神经退行性疾病, 其公认的病理特征是由于错误折叠的 α -突触核蛋白的聚集而引发多巴胺能神经毒性, 患者因为中脑多巴胺能神经元的逐渐丧失, 导致出现运动性和非运动性体征和症状. 有研究者发现, 氧化应激导致的线粒体功能障碍可引起 α -突触核蛋白的错误折叠和聚集以及EVs的分泌异常, 而异常分泌的EVs可能与PD引起的全身炎症反应相关^[82,83].

II型糖尿病也是与衰老相关的退行性代谢疾病, 普遍表现为胰岛素的缺乏或抵抗. 研究表明, 患者血液循环中EVs的水平明显比血糖控制正常的人更高, 而其EVs中胰岛素信号蛋白的水平也发生了改变, 循环系统中的白细胞内化了这种EVs, 最终改变了白细胞的功能^[84].

众所周知, 随着年龄增大, 急性冠状动脉综合征(acute coronary syndrome, ACS)的发病概率也会相应提高. 相关研究发现, ACS患者的内皮细胞在动脉粥样硬化中低剪切应力和促凝性的条件下分泌的EVs可通过血管紧张素II(angiotensin II)诱导激活对氧化还原敏感的丝裂原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase, MAPK)和磷酸肌醇3激酶(phosphoinositide 3 kinase, PI3K)/Akt信号通路, 继而引起内皮细胞的早衰^[85].

在各种癌症中, 由于癌细胞旺盛的增殖能力, 导致其耗氧量增加, 因此往往会引起肿瘤组织微环境的缺

氧, 而缺氧会影响EVs的分泌和功能, 在此环境下的癌细胞会产生更多的EVs^[41]. 研究发现, 缺氧诱导癌细胞产生的EVs在肿瘤的血管生成^[86]、侵袭、转移^[87]和免疫抑制^[88]过程中有着重要的作用.

骨关节炎(osteoarthritis, OA)影响了全球7%的人口, 全世界有超过5亿人饱受OA的困扰. 1990~2019年, 全球受OA影响的人数增加了48%, 其发病率有逐年上升的趋势^[89]. 年龄是原发性骨关节炎最明显的危险因素之一, 随着年龄的增长, 骨关节炎的发病率不断增加, 这是暴露于各种危险因素之中以及关节结构中年龄相关的生物学变化叠加引发的结果^[90]. OA是一种全关节性的疾病, 可包括关节软骨、软骨下骨、韧带、关节囊、滑膜和关节周围肌肉的结构改变^[91]. 有相关研究指出, EVs在OA的进展过程中也起着重要的作用. 例如, 软骨细胞、滑膜细胞、巨噬细胞、软骨下骨、髌下脂肪垫、肌腱和韧带等都可以在滑膜关节中分泌EVs^[92], 致病信号可通过EVs在OA影响的关节中不同类型的细胞之间传递, 打破了关节微环境的平衡, 从而加剧了OA的发展^[93]; 来自血管内皮细胞的EVs通过抑制自噬和p21的表达降低了软骨细胞抵抗氧化应激的能力, 使细胞内ROS的含量增加并最终诱导细胞凋亡^[94]等.

由上述例子可见EVs在多种与氧化和衰老过程相关的疾病中扮演着调节中介的角色(表1).

5 细胞外囊泡在氧化相关的组织再生中的作用机制

在氧化相关的组织再生过程中, EVs同样发挥着重要的作用. 除了直接影响氧化还原体系外, 还可能通过调节信号转导, 诱导基因表达等途径, 参与多种组织细胞的生长、分化、凋亡等过程. 不少关于EVs在其他不同组织中参与氧化相关的组织再生的研究已见报道.

对心脏和血管再生的相关研究发现, 组织缺血时, 心脏祖细胞衍生的EVs可参与递送多种抗凋亡细胞因子、促血管生成的miRNA等, 以增加靶细胞对氧化应激损伤的抵抗, 抑制细胞凋亡, 促进心肌组织的再生^[96]; 而内皮细胞衍生的EVs则可促进ROS的产生, 诱导骨髓单核细胞(BM-derived mononuclear cell, BM-MNC)分化为内皮祖细胞(endothelial progenitor cell,

EPC), 继而进一步分化并促进新生血管的形成^[76]. 预先用过氧化氢预处理的脂肪来源间充质干细胞衍生的外泌体显著改善了人脐静脉内皮细胞(human umbilical vein endothelial cells, HUVEC)的迁移和血管形成, 减轻了皮瓣移植缺血/再灌注(I/R)损伤中的炎症反应和凋亡, 促进皮瓣新血管形成^[97].

关于肝脏损伤后再生过程的研究中, 间充质干细胞分泌的EVs虽然不能直接通过调节氧化应激减轻肝细胞的损伤, 但可以通过诱导肝细胞中再生基因的表达, 激活其增殖和再生反应, 对肝的毒性损伤产生保护作用^[98].

在肾脏损伤的修复和再生领域, 同样有研究发现EVs在其中的作用. 研究人员发现, 由MSCs分泌的EVs可作为遗传物质水平转移的载体, 向靶细胞内传递特定的mRNA, 进而刺激受损的细胞重新进入细胞周期^[99]. 例如, 另一组研究表明, 骨髓来源的MSC衍生的EVs中存在IGF-1受体mRNA, 其向肾小管细胞的转移是触发肾脏修复的基础^[100].

成年人的中枢神经系统中, 含有具无限自我更新能力的多能神经干细胞(neural stem cells, NSCs), 神经元、星形胶质细胞和少突胶质细胞均由其分化而来^[101]. NADPH氧化酶2(NADPH oxidase, NOX2)衍生的H₂O₂可以通过使磷酸酶PTEN氧化失活而激活PI3K/Akt/mTOR信号转导途径, 作为信号分子起维持神经干细胞群的正常生长增殖和神经源性潜能的生理作用^[102,103]. 在损伤后的轴突再生过程中, 巨噬细胞以EVs为载体, 将传递NOX2和氧化还原信号转运至损伤部位, 以与神经干细胞相似的效果促进轴突生长和非再生损伤部位的再生^[104]. 坐骨神经切断后, 巨噬细胞释放了背根神经节吸收的含NOX2的EVs. 这些EVs被转运到背根神经节细胞后, 导致磷酸酶和张力蛋白同源物的氧化和失活, PI3K/Akt信号传导的激活和神经节细胞的生长. 但使用抗氧化剂NAC在坐骨神经上后发现, 抗氧化剂对脊髓损伤后背根神经节的生长具有明显限制作用^[105].

在皮肤组织中同样存在EVs. 有研究者通过透射电子显微镜对皮肤切片的观察发现, 真皮细胞内及真皮细胞周围都存在EVs样的结构, 而且这些结构都对EVs的CD63标记呈阳性. 进一步的研究发现, miR-23a-3p与转化生长因子 β (transforming growth factor β)诱导的上皮-间充质细胞转化、细胞衰老和皮肤老化

表 1 EVs可能在氧化和衰老过程相关的疾病中以不同的机制产生的作用**Table 1** Possible roles of EVs through different mechanisms in diseases associated with oxidation and aging processes

与衰老相关的疾病	EVs的来源	相关的特征	潜在的作用机制	参考文献
阿尔兹海默症	神经元细胞、小鼠脑组织	EVs中包含有淀粉样蛋白 β 单体、寡聚体和miRNA; 阿尔兹海默症小鼠脑中收集的EVs中缺乏参与脑发育、衰老、免疫应答和氧化还原维持的蛋白质	神经元细胞释放携带A β , oA β 的EVs被小胶质细胞吸收, 然后以溶酶体系统降解A β , 而当清除功能不能正常生效时, A β 可以在细胞外产生神经毒性淀粉样斑块(AP); 因缺乏相关蛋白质导致细胞的正常生理功能受损	[49,50,79,81,95]
帕金森综合征	神经元细胞	氧化应激导致的线粒体功能障碍引起 α -突触核蛋白的错误折叠和聚集, 以及EVs的分泌异常	Akt/PKB和错误折叠的 α -突触核蛋白可引发线粒体缺陷, 随之产生的EVs将影响扩散而引发全身性炎症反应	[82,83]
II型糖尿病	红细胞	胰岛素抵抗增加了红细胞EVs的分泌, EVs中胰岛素信号蛋白的水平发生改变	II型糖尿病患者红细胞分泌的EVs主要被白细胞内化, 导致单核细胞抗凋亡基因的上调, 可能导致其分化增加; EVs还可抑制单核细胞氧化应激反应途径, 从而影响其吞噬功能.	[84]
急性冠状动脉综合征	血管内皮细胞	EVs中NADPH氧化酶亚基的上调, eNOS的下调	衰老的血管内皮细胞分泌的EVs, 诱导年轻内皮细胞中的ROS形成, 同时下调年轻内皮细胞中内皮型一氧化氮合酶(endothelial nitric oxide synthase, eNOS)的表达水平, 抑制其介导的NO通路; 通过激活MAPK和PI3K/Akt信号通路而引起血管内皮细胞的早衰	[85]
癌症	癌细胞	缺氧条件下, 癌细胞比正常氧条件下分泌更多的EVs, EVs中多种相关miRNA及蛋白质增加	缺氧环境下, 癌细胞的EVs分泌量增加. 通过EVs将各种miRNA和功能性蛋白转移到靶细胞中, 调节靶细胞的基因表达、信号转导等活动, 实现促进血管生成、增加癌细胞的迁移和侵袭能力、调节免疫反应等效果	[86~88]
骨关节炎	软骨细胞、滑膜细胞、巨噬细胞、血管内皮细胞等	EVs中携带多种促炎因子、基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinases, MMPs)和miR-1246	在关节中不同类型的细胞之间传递促炎因子, 加剧炎症反应; 降低了软骨细胞抵抗氧化应激的能力, 最终诱导其凋亡	[89~94]

密切相关, 而短期存在的衰老的成纤维细胞所衍生的EVs和衰老相关分泌表型(senescence-associated secretory phenotype, SASP)则可以miR-23a-3p作为调节信号增强伤口愈合和皮肤组织的再生^[106]. 但也有报道显示外泌体通过调节自由基, 阻碍损伤后愈合. 研究人员发现从糖尿病患者血液中提取的外泌体内miR-15a-3p上调, 它通过NOX5/ROS信号通路, 抑制NADPH氧化酶损害HUVEC的血管生成和存活, 导致伤口愈合阻碍^[107].

运动产生的机械应力可能诱导骨骼肌细胞质膜的损伤^[108], 修复其损伤的过程需要线粒体的参与. 在这个过程中, 线粒体钙单向转运蛋白介导了对细胞质中Ca²⁺的摄取, Ca²⁺的吸收会暂时增加线粒体ROS的产生, 继而局部激活GTPase RhoA, 从而触发F-肌动蛋白在损伤部位的累积并促进质膜修复^[109]. C2C12成肌细胞可分泌携带mtDNA和多种信号蛋白的EVs, 通过将功能相关蛋白和mtDNA向靶细胞转移, 以恢复靶细胞

的线粒体功能并协调肌肉组织损伤修复的过程^[110] (表2).

6 细胞外囊泡的临床转化应用

EVs可以携带各种特殊生物分子、功能蛋白和核酸^[13~16], 而且根据EVs内含物组成的不同, 其生物功能也随之改变^[9]. EVs是疾病早期诊断标志物的重要来源^[111], 也是治疗多种疾病的一种有前景的治疗工具. 目前EVs的临床应用尚未涉及氧化应激机制相关内容, 下文将总结EVs在再生及老化领域的重点研究, 以期将来氧化应激相关的EVs提供重要基础.

6.1 干细胞来源的EVs促进组织再生的无细胞治疗

EVs的生物性质, 其作为药物及其他功能分子运输载体的潜力受到越来越多的关注^[17]. 众所周知, 传

表 2 关于EVs在不同组织中参与氧化相关的组织再生的相关研究

Table 2 Related studies on the involvement of EVs in oxidation-related tissue regeneration of different tissues

作用组织	EVs的来源	作用细胞	作用机制	功能活性物质	参考文献
心脏	心脏干细胞、心脏内皮细胞、心脏成纤维细胞	心肌细胞、内皮细胞	通过激活促生存相关通路增加心脏祖细胞对缺氧应激的抵抗; 传递多种具有抑制细胞凋亡的细胞因子; 传递多种促血管生成的miRNA	miRNA, IGF-1, TGF- β , VEGF	[96]
血管	内皮细胞	骨髓单核细胞	促进ROS的产生, 诱导骨髓单核细胞, 分化为血管内皮祖细胞	NADPH氧化酶, eNOS, PI3K	[76]
肝脏	MSCs	肝细胞	诱导CCl ₄ 损伤后肝组织中肝细胞中再生基因的表达	IL6ST/gp130, TNFRSF1A/TNFR1和CXCL2/MIP-2蛋白	[98]
肾脏	MSC	肾小管细胞	促进细胞增殖并保护细胞免于凋亡, 促进肾小管细胞去分化和生长	mRNA(IGF-1 receptor mRNA), miRNA	[99,100]
神经系统	巨噬细胞	NSC、神经节细胞等	作为载体传递NOX2和氧化应激信号, 激活PI3k/Akt/mTOR信号转导途径, 促进细胞增殖生长和非再生损伤部位的再生	NOX2, H ₂ O ₂	[102~105]
皮肤	成纤维细胞(human dermal fibroblasts, HDF)	角质形成细胞	EVs将miRNA从成纤维细胞转移到角质形成细胞, 促进角质形成细胞的终末分化	miRNA(miR-23a-3p)	[97,106]
肌肉	成肌细胞(C2C12)	成肌细胞、骨骼肌细胞	Ca ²⁺ 吸收增加ROS的产生, 激活GTPase RhoA, 触发F-肌动蛋白在损伤部位的累积以促进质膜修复; EVs通过传递mtDNA和多种信号分子恢复线粒体功能及协调组织修复过程	mtDNA, GTPase, small GTP-binding protein	[108~110]

统化学合成药物因缺乏靶向性, 难以针对单一的目标, 而包括siRNA和重组蛋白在内的生物疗法则容易降解, 穿越生物膜的能力有限, 并可能引发免疫反应^[17].

间充质干细胞是多功能的非造血成体干细胞, 具有分化成骨细胞、软骨细胞、脂肪细胞、内皮细胞、心血管细胞和神经源细胞类型的潜力^[112], 是组织修复和伤口愈合的潜在解决方案^[113], 并且由于其离体扩增能力和伦理上的可接受性而使人们对其有用作治疗手段的信心^[112]. MSCs治疗的再生潜力(至少有部分)是通过旁分泌作用介导的. 已有研究发现, MSCs在旁分泌过程中, 除了分泌一系列可溶性因子之外, 还释放出大量的EVs^[114]. 外源性的MSCs和其他干细胞复杂的旁分泌再生作用在一定程度上是通过释放的EVs介导信息传递和调控基因进行沟通的^[114~116]. 可见, 从培养的间充质干细胞中提取的EVs有可能成为一种安全、有效的无细胞疗法^[11].

研究人员发现, 在中波紫外线诱导的光老化和自然衰老模型中, 人为诱导的多能干细胞来源的外泌体(iPSC-Exo)改善了光老化皮肤成纤维细胞的基因型和

表型变化. 从机制上讲, iPSC-Exo的有益作用是通过降低衰老相关的 β -半乳糖苷酶和基质降解酶(matrix-degrading enzymes, MMP-1/3)的表达水平并恢复衰老HDF中的I型胶原蛋白表达^[117]. 衰老细胞随时间积累在各种组织中, 并导致组织功能障碍和衰老相关的表型. Bae等人^[118]研究了源自胚胎干细胞的外泌体介导的抗衰老特性, 发现这种外泌体含mmu-miR-291a-3p, 可通过TGF- β 受体2途径逆转皮肤成纤维细胞的衰老.

有研究指出, 哺乳动物NAD⁺的合成下降和消耗增加引起的NAD⁺利用率下降在衰老过程起重要作用, 而NAD⁺的合成与烟酰胺磷酸核糖基转移酶(nicotinamide phosphoribosyltransferase, NAMPT)密切相关^[119]. 对小鼠的研究发现, 随着年龄的增长, 循环系统中细胞外烟酰胺磷酸核糖基转移酶(eNAMPT)水平显著下降. 通过脂肪组织特异性NAMPT的过表达来增加衰老小鼠的循环eNAMPT水平, 会增加多种组织中的NAD⁺水平, 可增强雌性小鼠的生理功能并延长它们的健康期. eNAMPT在小鼠和人类循环系统中由EVs携带, 含有

eNAMPT的EVs可被细胞内化并增强其NAD⁺的生物合成. 该机制可促进全身NAD⁺的生物合成并减缓衰老, 这可能是人类抗衰老的一个潜在途径^[120].

在很多细胞层面的研究中发现, 多种不同细胞来源EVs对OA和软骨损伤具有一定的治疗作用^[121].

6.2 EVs作为功能性载体的优势和前景

EVs具有与细胞膜相似的膜结构^[6-8], 能有效保护内容物在释放到靶细胞前不被降解, 而且其可通过多种方式向靶细胞释放内容物^[122], 可有效针对目标细胞. 已有研究表明, EVs本身具有生物分子运输、细胞间通信、参与细胞生长增殖和凋亡过程、细胞免疫、细胞信号转导等功能^[111,123-125], 而且纯化的EVs在多种体外和体内模型中均具有生物活性^[126], 是作为药物及其他功能分子运输载体的理想对象.

目前已有不少将EVs作为治疗工具使用的尝试, 如使用EVs治疗用于降低肾脏的氧化应激^[127]和实验性结肠炎^[128]、MSCs来源的EVs治疗中风^[114]等. 与分离天然产生的EVs相比, 人工合成EVs的方法更能有效提高其产量^[129], 以生物工程的方法使用EVs作为药物递送的载体是相当有前景的研究方向^[130,131].

6.3 分子标记物

目前对于EVs的收集、分离、浓缩等处理方法已经日渐成熟^[3,132], 其携带的核酸、蛋白质、脂质等内含物的功能和意义已经有大量的研究报道^[111,123-125], 也有如Vesiclepedia和ExoCarta等的公共的在线数据库可供研究者使用^[16,133]. 通过对不同来源的EVs中分离的成分进行鉴定, 可为相关疾病的诊断提供有效信息. EVs作为诸如HIV感染^[134]、癌症^[135]等多种疾病生物标志物来源的相关研究目前已有报道.

普遍的研究表明, 肿瘤缺氧是实体瘤的共同特征, 其导致肿瘤治疗后的不良预后. 这主要是由于低氧细胞对放射和化学疗法的抵抗力增强以及低氧细胞与转移发展的增加相关. 已有大量证据表明EV在诱导肿瘤低氧耐受性中起关键作用^[43].

阿尔兹海默症的病理特征是A β 和高磷酸化tau蛋白的积累, 脑脊液中A β 1-42, 总tau和p-tau181是AD早期诊断的最佳分子标记物, 但脑脊液的采集相对于抽血的入侵性限制了其应用^[136]. 在血液中, 脑源性分子的极低浓度和复杂的基质阻碍了对AD生物标记物的

检测^[137]. 近来已有研究发现, AD患者血浆中分离的神经源性EVs显示出更高的A β 1-42, 总tau, p-T181 tau和p-S396 tau水平, 提供了较高的疾病可预测性^[79].

前文提及了EVs在帕金森综合征中的作用机制, EVs在其中运输载体的作用引起了研究人员的关注, 目前已有研究者通过在PD患者的血清中分离出EVs, 并试图从其内含物中鉴定出PD的候选生物标记物^[82].

随着相关研究的深入展开以及EVs的收集、制备、储存和分离等技术的发展, 将有效推动EVs作为生物标志物的应用.

7 未来研究方向展望

氧化还原体系是影响衰老和再生的关键环节之一, 而EVs在相关的过程中发挥着重要的作用. 退行性疾病的到来通常意味着老年黄金岁月遭受破坏, 这些疾病降低了生活质量. 人在最后几年的时光往往会给社会带来巨大的成本负担. 延长健康寿命的新解决方案需要结合再生医学研究, 再生医学是一个新的研究和实践领域, 其重心从抗击疾病转移到重建健康, 通过再生医学研究延长寿命, 探寻衰老的秘密令众多科学家着迷. 既往研究充分证实了氧化还原体系是影响衰老和再生的关键环节之一, 然而二者的相互关系及具体机制尚未明晰. EVs作为新兴的生物信息传递载体及再生工程的明日之星为这一议题注入了新的活力, 对EVs与细胞氧化还原平衡之间相互作用的深入研究有助于解释衰老和再生的作用机制. 此外, EVs还具备临床应用的巨大前景. 然而未来仍存在一些关键问题亟待解决:

(i) 寻找合适的研究模型, 针对同一组织分别开展EVs在氧化还原相关再生及衰老中的作用. 人类晶状体具终身生长的特征, 通过晶状体上皮细胞(lens epithelial cells, LECs)增殖分化可以实现一定程度的晶状体再生^[138]. 研究发现, ROS对LEC的伤口愈合过程有双重作用, 低浓度的ROS会增加LEC的迁移和活力, ROS诱导的EVs可增强正常LEC的上皮间质转化(epithelial-mesenchymal transition, EMT), 从而促进晶状体的损伤后再生过程, 但较高浓度的ROS反而会抑制上述过程^[139]. EVs参与ROS诱导LEC的EMT的具体机制目前还未明晰, 相信这会是一个富有潜力的研究方向.

(ii) 由干细胞启动的再生程序以年轻细胞代替衰老细胞, 而清除衰老细胞可为细胞再生提供空间, 替换比例的增高可使机体更为年轻。目前研究主要关注 EVs 对新细胞再生的影响, 但 EVs 如何参与衰老细胞的清除也不应忽略。

(iii) 对 EVs 的分离和表征缺乏统一且重复性良好的标准化手段, 使用不同的方法可能令研究结果产生

较大差异。EVs 作为天然的非细胞性材料, 在临床应用上具有诸多优势, 对于衰老性疾病以及再生治疗方面更是极富潜力。但目前的研究进展仍然处于基础阶段, 仍需解决 EVs 的分离和表征方法, 或者修饰和载药方式的相关问题。期待未来随着研究的深入, 可建立起标准化分离和表征乃至生产应用 EVs 的技术, 可以 EVs 作为疾病诊断或治疗的有力工具。

参考文献

- 1 van Niel G, D'Angelo G, Raposo G. Shedding light on the cell biology of extracellular vesicles. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2018, 19: 213–228
- 2 Johnstone R M, Adam M, Hammond J R, et al. Vesicle formation during reticulocyte maturation. Association of plasma membrane activities with released vesicles (exosomes). *J Biol Chem*, 1987, 262: 9412–9420
- 3 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. *J Extracell Vesicles*, 2018, 7: 1535750
- 4 Abels E R, Breakefield X O. Introduction to extracellular vesicles: biogenesis, RNA cargo selection, content, release, and uptake. *Cell Mol Neurobiol*, 2016, 36: 301–312
- 5 Cocozza F, Grisard E, Martin-Jaular L, et al. SnapShot: extracellular vesicles. *Cell*, 2020, 182: 262–262.e1
- 6 Llorente A, Skotland T, Sylvänne T, et al. Molecular lipidomics of exosomes released by PC-3 prostate cancer cells. *Biochim Biophys Acta (BBA)-Mol Cell Biol Lipids*, 2013, 1831: 1302–1309
- 7 Basu J, Ludlow J W. Exosomes for repair, regeneration and rejuvenation. *Expert Opin Biol Ther*, 2016, 16: 489–506
- 8 Raposo G, Stoorvogel W. Extracellular vesicles: exosomes, microvesicles, and friends. *J Cell Biol*, 2013, 200: 373–383
- 9 Willms E, Johansson H J, Mäger I, et al. Cells release subpopulations of exosomes with distinct molecular and biological properties. *Sci Rep*, 2016, 6: 22519
- 10 Zhang H, Freitas D, Kim H S, et al. Identification of distinct nanoparticles and subsets of extracellular vesicles by asymmetric flow field-flow fractionation. *Nat Cell Biol*, 2018, 20: 332–343
- 11 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
- 12 Bister N, Pistono C, Huremagic B, et al. Hypoxia and extracellular vesicles: a review on methods, vesicular cargo and functions. *J Extracell Vesicles*, 2020, 10
- 13 An M, Lohse I, Tan Z, et al. Quantitative proteomic analysis of serum exosomes from patients with locally advanced pancreatic cancer undergoing chemoradiotherapy. *J Proteome Res*, 2017, 16: 1763–1772
- 14 Lai X, Wang M, McElyea S D, et al. A microRNA signature in circulating exosomes is superior to exosomal glypican-1 levels for diagnosing pancreatic cancer. *Cancer Lett*, 2017, 393: 86–93
- 15 Mead B, Tomarev S. Bone marrow-derived mesenchymal stem cells-derived exosomes promote survival of retinal ganglion cells through miRNA-dependent mechanisms. *Stem Cells Transl Med*, 2017, 6: 1273–1285
- 16 Mathivanan S, Fahner C J, Reid G E, et al. ExoCarta 2012: database of exosomal proteins, RNA and lipids. *Nucl Acids Res*, 2012, 40: D1241–D1244
- 17 Kooijmans S A A, Vader P, van Dommelen S M, et al. Exosome mimetics: a novel class of drug delivery systems. *Int J Nanomed*, 2012, 7: 1525
- 18 Simons M, Raposo G. Exosomes—vesicular carriers for intercellular communication. *Curr Opin Cell Biol*, 2009, 21: 575–581
- 19 Caby M P, Lankar D, Vincendeau-Scherrer C, et al. Exosomal-like vesicles are present in human blood plasma. *Int Immunol*, 2005, 17: 879–887
- 20 Street J M, Koritzinsky E H, Glispie D M, et al. Urine exosomes: an emerging trove of biomarkers. *Adv Clinical Chem*, 2017, 78: 103–122
- 21 Vella L J, Sharples R A, Lawson V A, et al. Packaging of prions into exosomes is associated with a novel pathway of PrP processing. *J Pathol*, 2007, 211: 582–590

- 22 Montecalvo A, Larregina A T, Morelli A E. Methods of purification of CTL-derived exosomes. *Methods Mol Biol*, 2014, 1186: 87–102
- 23 Domenyuk V, Zhong Z, Stark A, et al. Plasma exosome profiling of cancer patients by a next generation systems biology approach. *Sci Rep*, 2017, 7: 42741
- 24 Sun H, Yao W, Tang Y, et al. Urinary exosomes as a novel biomarker for evaluation of α -lipoic acid's protective effect in early diabetic nephropathy. *J Clin Lab Anal*, 2017, 31: e22129
- 25 Belting M, Christianson H C. Role of exosomes and microvesicles in hypoxia-associated tumour development and cardiovascular disease. *J Intern Med*, 2015, 278: 251–263
- 26 Svensson K J, Kucharzewska P, Christianson H C, et al. Hypoxia triggers a proangiogenic pathway involving cancer cell microvesicles and PAR-2-mediated heparin-binding EGF signaling in endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2011, 108: 13147–13152
- 27 Collino F, Bruno S, Incarnato D, et al. AKI recovery induced by mesenchymal stromal cell-derived extracellular vesicles carrying microRNAs. *J Am Soc Nephrol*, 2015, 26: 2349–2360
- 28 Veerman R E, Güçlüler Akpınar G, Eldh M, et al. Immune cell-derived extracellular vesicles—functions and therapeutic applications. *Trends Mol Med*, 2019, 25: 382–394
- 29 Gambim M, de Oliveira do Carmo A, Marti L, et al. Platelet-derived exosomes induce endothelial cell apoptosis through peroxynitrite generation: experimental evidence for a novel mechanism of septic vascular dysfunction. *Crit Care*, 2007, 11: R107
- 30 Théry C, Duban L, Segura E, et al. Indirect activation of naïve CD4⁺ T cells by dendritic cell-derived exosomes. *Nat Immunol*, 2002, 3: 1156–1162
- 31 Gross J C, Chaudhary V, Bartscherer K, et al. Active Wnt proteins are secreted on exosomes. *Nat Cell Biol*, 2012, 14: 1036–1045
- 32 Théry C, Ostrowski M, Segura E. Membrane vesicles as conveyors of immune responses. *Nat Rev Immunol*, 2009, 9: 581–593
- 33 Al-Nedawi K, Meehan B, Micallef J, et al. Intercellular transfer of the oncogenic receptor EGFRvIII by microvesicles derived from tumour cells. *Nat Cell Biol*, 2008, 10: 619–624
- 34 Peinado H, Alečković M, Lavotshkin S, et al. Melanoma exosomes educate bone marrow progenitor cells toward a pro-metastatic phenotype through MET. *Nat Med*, 2012, 18: 883–891
- 35 Svensson K J, Belting M. Role of extracellular membrane vesicles in intercellular communication of the tumour microenvironment. *Biochem Soc Trans*, 2013, 41: 273–276
- 36 Gould S J, Booth A M, Hildreth J E K. The Trojan exosome hypothesis. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, 100: 10592–10597
- 37 Fevrier B, Vilette D, Archer F, et al. Cells release prions in association with exosomes. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2004, 101: 9683–9688
- 38 Alais S, Simoes S, Baas D, et al. Mouse neuroblastoma cells release prion infectivity associated with exosomal vesicles. *Biol Cell*, 2008, 100: 603–618
- 39 Marar C, Starich B, Wirtz D. Extracellular vesicles in immunomodulation and tumor progression. *Nat Immunol*, 2021, 22: 560–570
- 40 Deep G, Schlaepfer I R. Aberrant lipid metabolism promotes prostate cancer: role in cell survival under hypoxia and extracellular vesicles biogenesis. *Int J Mol Sci*, 2016, 17: 1061
- 41 Shao C, Yang F, Miao S, et al. Role of hypoxia-induced exosomes in tumor biology. *Mol Cancer*, 2018, 17: 120
- 42 Yaghoubi S, Najminejad H, Dabaghian M, et al. How hypoxia regulate exosomes in ischemic diseases and cancer microenvironment? *IUBMB Life*, 2020, 72: 1286–1305
- 43 Zonneveld M I, Keulers T G H, Rouschop K M A. Extracellular vesicles as transmitters of hypoxia tolerance in solid cancers. *Cancers*, 2019, 11: 154
- 44 Borrás C, Mas-Bargues C, Sanz-Ros J, et al. Extracellular vesicles and redox modulation in aging. *Free Radical Biol Med*, 2020, 149: 44–50
- 45 Genestra M. Oxyl radicals, redox-sensitive signalling cascades and antioxidants. *Cell Signalling*, 2007, 19: 1807–1819
- 46 Kaarniranta K, Pawlowska E, Szczepanska J, et al. Role of mitochondrial DNA damage in ROS-mediated pathogenesis of age-related macular degeneration (AMD). *Int J Mol Sci*, 2019, 20: 2374
- 47 Ji C, Amarnath V, Pietenpol J A, et al. 4-Hydroxynonenal induces apoptosis via caspase-3 activation and cytochrome *c* release. *Chem Res Toxicol*, 2001, 14: 1090–1096
- 48 Rong X, Qiu X, Jiang Y, et al. Effects of histone acetylation on superoxide dismutase 1 gene expression in the pathogenesis of senile cataract. *Sci Rep*, 2016, 6: 34704
- 49 Soria Lopez J A, Gonzalez H M, Leger G C. Alzheimer's disease. *Handb Clin Neurol*, 2019, 167: 231–255

- 50 Chen Z, Zhong C. Oxidative stress in Alzheimer's disease. *Neurosci Bull*, 2014, 30: 271–281
- 51 Binder C J, Papac-Milicevic N, Witztum J L. Innate sensing of oxidation-specific epitopes in health and disease. *Nat Rev Immunol*, 2016, 16: 485–497
- 52 Bodega G, Alique M, Puebla L, et al. Microvesicles: ROS scavengers and ROS producers. *J Extracell Vesicles*, 2019, 8: 1626654
- 53 Chandrasekaran A, Idelchik M D P S, Melendez J A. Redox control of senescence and age-related disease. *Redox Biol*, 2017, 11: 91–102
- 54 Birben E, Sahiner U M, Sackesen C, et al. Oxidative stress and antioxidant defense. *World Allergy Organiz J*, 2012, 5: 9–19
- 55 Wu J Q, Kosten T R, Zhang X Y. Free radicals, antioxidant defense systems, and schizophrenia. *Prog Neuro-Psychopharmacol Biol Psychiatry*, 2013, 46: 200–206
- 56 Pisoschi A M, Pop A. The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: a review. *Eur J Med Chem*, 2015, 97: 55–74
- 57 Venkataraman K, Khurana S, Tai T C. Oxidative stress in aging-matters of the heart and mind. *Int J Mol Sci*, 2013, 14: 17897–17925
- 58 Banerjee J, Khanna S, Bhattacharya A. MicroRNA regulation of oxidative stress. *Oxid Med Cell Longev*, 2017, 2017: 1–3
- 59 Di Meo S, Reed T T, Venditti P, et al. Role of ROS and RNS sources in physiological and pathological conditions. *Oxid Med Cell Longev*, 2016, 2016: 1–44
- 60 Jackson M J. Control of reactive oxygen species production in contracting skeletal muscle. *Antioxid Redox Signal*, 2011, 15: 2477–2486
- 61 Powers S K, Jackson M J. Exercise-induced oxidative stress: cellular mechanisms and impact on muscle force production. *Physiol Rev*, 2008, 88: 1243–1276
- 62 Winterbourn C C, Kettle A J, Hampton M B. Reactive oxygen species and neutrophil function. *Annu Rev Biochem*, 2016, 85: 765–792
- 63 Mittal M, Siddiqui M R, Tran K, et al. Reactive oxygen species in inflammation and tissue injury. *Antioxid Redox Signal*, 2014, 20: 1126–1167
- 64 Lassègue B, Griendling K K. Reactive oxygen species in hypertension; an update. *Am J Hypertension*, 2004, 17: 852–860
- 65 Nauseef W M. How human neutrophils kill and degrade microbes: an integrated view. *Immunol Rev*, 2007, 219: 88–102
- 66 Le Moal E, Pialoux V, Juban G, et al. Redox control of skeletal muscle regeneration. *Antioxid Redox Signal*, 2017, 27: 276–310
- 67 Quan H, Koltai E, Suzuki K, et al. Exercise, redox system and neurodegenerative diseases. *Biochim Biophys Acta (BBA)-Mol Basis Dis*, 2020, 1866: 165778
- 68 Cooper S T. Ca^{2+} and mitochondrial ROS: both hero and villain in membrane repair. *Sci Signal*, 2017, 10
- 69 Yarana C, St Clair D K. Chemotherapy-induced tissue injury: an insight into the role of extracellular vesicles-mediated oxidative stress responses. *Antioxidants*, 2017, 6: 75
- 70 Benedikter B J, Weseler A R, Wouters E F M, et al. Redox-dependent thiol modifications: implications for the release of extracellular vesicles. *Cell Mol Life Sci*, 2018, 75: 2321–2337
- 71 Burger D, Kwart D G, Montezano A C, et al. Microparticles induce cell cycle arrest through redox-sensitive processes in endothelial cells: implications in vascular senescence. *J Am Heart Assoc*, 2012, 1: e001842
- 72 Kong H, Chandel N S. Regulation of redox balance in cancer and T cells. *J Biol Chem*, 2018, 293: 7499–7507
- 73 Bodega G, Alique M, Bohórquez L, et al. The antioxidant machinery of young and senescent human umbilical vein endothelial cells and their microvesicles. *Oxid Med Cell Longev*, 2017, 2017: 1–12
- 74 Soleti R, Lauret E, Andriantsitohaina R, et al. Internalization and induction of antioxidant messages by microvesicles contribute to the antiapoptotic effects on human endothelial cells. *Free Radical Biol Med*, 2012, 53: 2159–2170
- 75 Burger D, Turner M, Munkonda M N, et al. Endothelial microparticle-derived reactive oxygen species: role in endothelial signaling and vascular function. *Oxid Med Cell Longev*, 2016, 2016: 1–10
- 76 Leroyer A S, Ebrahimian T G, Cochain C, et al. Microparticles from ischemic muscle promotes postnatal vasculogenesis. *Circulation*, 2009, 119: 2808–2817
- 77 Gray W D, French K M, Ghosh-Choudhary S, et al. Identification of therapeutic covariant microRNA clusters in hypoxia-treated cardiac progenitor cell exosomes using systems biology. *Circ Res*, 2015, 116: 255–263
- 78 Wang H, Wang Z H, Kong J, et al. Oxidized low-density lipoprotein-dependent platelet-derived microvesicles trigger procoagulant effects and amplify oxidative stress. *Mol Med*, 2012, 18: 159–166
- 79 Lee S, Mankhong S, Kang J H. Extracellular vesicle as a source of Alzheimer's biomarkers: opportunities and challenges. *Int J Mol Sci*, 2019, 20: 1728
- 80 Agnati L F, Guidolin D, Guescini M, et al. Understanding wiring and volume transmission. *Brain Res Rev*, 2010, 64: 137–159

- 81 Rajendran L, Honsho M, Zahn T R, et al. Alzheimer's disease β -amyloid peptides are released in association with exosomes. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2006, 103: 11172–11177
- 82 Picca A, Guerra F, Calvani R, et al. Mitochondrial-derived vesicles as candidate biomarkers in Parkinson's disease: rationale, design and methods of the EXosomes in PARKinson disease (EXPAND) study. *Int J Mol Sci*, 2019, 20: 2373
- 83 Puspita L, Chung S Y, Shim J W. Oxidative stress and cellular pathologies in Parkinson's disease. *Mol Brain*, 2017, 10: 53
- 84 Freeman D W, Noren Hooten N, Eitan E, et al. Altered extracellular vesicle concentration, cargo, and function in diabetes. *Diabetes*, 2018, 67: 2377–2388
- 85 Abbas M, Jesel L, Auger C, et al. Endothelial microparticles from acute coronary syndrome patients induce premature coronary artery endothelial cell aging and thrombogenicity. *Circulation*, 2017, 135: 280–296
- 86 Umezu T, Tadokoro H, Azuma K, et al. Exosomal miR-135b shed from hypoxic multiple myeloma cells enhances angiogenesis by targeting factor-inhibiting HIF-1. *Blood*, 2014, 124: 3748–3757
- 87 Li L, Li C, Wang S, et al. Exosomes derived from hypoxic oral squamous cell carcinoma cells deliver miR-21 to normoxic cells to elicit a prometastatic phenotype. *Cancer Res*, 2016, 76: 1770–1780
- 88 Ye S B, Zhang H, Cai T T, et al. Exosomal miR-24-3p impedes T-cell function by targeting *FGF11* and serves as a potential prognostic biomarker for nasopharyngeal carcinoma. *J Pathol*, 2016, 240: 329–340
- 89 Hunter D J, March L, Chew M. Osteoarthritis in 2020 and beyond: a lancet commission. *Lancet*, 2020, 396: 1711–1712
- 90 Allen K D, Thoma L M, Golightly Y M. Epidemiology of osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage*, 2022, 30: 184–195
- 91 Hunter D J, Bierma-Zeinstra S. Osteoarthritis. *Lancet*, 2019, 393: 1745–1759
- 92 Ni Z, Zhou S, Li S, et al. Exosomes: roles and therapeutic potential in osteoarthritis. *Bone Res*, 2020, 8: 25
- 93 Samavedi S, Diaz-Rodriguez P, Erndt-Marino J D, et al. A three-dimensional chondrocyte-macrophage coculture system to probe inflammation in experimental osteoarthritis. *Tissue Eng Part A*, 2017, 23: 101–114
- 94 Yang R Z, Zheng H L, Xu W N, et al. Vascular endothelial cell-secreted exosomes facilitate osteoarthritis pathogenesis by promoting chondrocyte apoptosis. *Aging*, 2021, 13: 4647–4662
- 95 Hurwitz S N, Sun L, Cole K Y, et al. An optimized method for enrichment of whole brain-derived extracellular vesicles reveals insight into neurodegenerative processes in a mouse model of Alzheimer's disease. *J Neurosci Methods*, 2018, 307: 210–220
- 96 Chistiakov D A, Orekhov A N, Bobryshev Y V. Cardiac extracellular vesicles in normal and infarcted heart. *Int J Mol Sci*, 2016, 17: 63
- 97 Bai Y, Han Y, Yan X L, et al. Adipose mesenchymal stem cell-derived exosomes stimulated by hydrogen peroxide enhanced skin flap recovery in ischemia-reperfusion injury. *Biochem Biophys Res Commun*, 2018, 500: 310–317
- 98 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 Res Ther*, 2014, 5: 76
- 99 Grange C, Skovronova R, Marabese F, et al. Stem cell-derived extracellular vesicles and kidney regeneration. *Cells*, 2019, 8: 1240
- 100 Tomasoni S, Longaretti L, Rota C, et al. Transfer of growth factor receptor mRNA via exosomes unravels the regenerative effect of mesenchymal stem cells. *Stem Cells Dev*, 2013, 22: 772–780
- 101 Gage F H, Temple S. Neural stem cells: generating and regenerating the brain. *Neuron*, 2013, 80: 588–601
- 102 Le Belle J E, Orozco N M, Paucar A A, et al. Proliferative neural stem cells have high endogenous ROS levels that regulate self-renewal and neurogenesis in a PI3K/Akt-dependant manner. *Cell Stem Cell*, 2011, 8: 59–71
- 103 Dickinson B C, Peltier J, Stone D, et al. NOX2 redox signaling maintains essential cell populations in the brain. *Nat Chem Biol*, 2011, 7: 106–112
- 104 Krishnamoorthy L, Chang C J. Exosomal NADPH oxidase: delivering redox signaling for healing. *Biochemistry*, 2018, 57: 3993–3994
- 105 Hervera A, De Virgiliis F, Palmisano I, et al. Reactive oxygen species regulate axonal regeneration through the release of exosomal NADPH oxidase 2 complexes into injured axons. *Nat Cell Biol*, 2018, 20: 307–319
- 106 Terlecki-Zaniewicz L, Pils V, Bobbili M R, et al. Extracellular vesicles in human skin: cross-talk from senescent fibroblasts to keratinocytes by miRNAs. *J Invest Dermatol*, 2019, 139: 2425–2436.e5
- 107 Xiong Y, Chen L, Yu T, et al. Inhibition of circulating exosomal microRNA-15a-3p accelerates diabetic wound repair. *Aging*, 2020, 12: 8968–8986
- 108 McNeil P L, Khakee R. Disruptions of muscle fiber plasma membranes. Role in exercise-induced damage. *Am J Pathol*, 1992, 140: 1097–1109

- 109 Horn A, Van der Meulen J H, Defour A, et al. Mitochondrial redox signaling enables repair of injured skeletal muscle cells. *Sci Signal*, 2017, 10
- 110 Guescini M, Guidolin D, Vallorani L, et al. C2C12 myoblasts release micro-vesicles containing mtDNA and proteins involved in signal transduction. *Exp Cell Res*, 2010, 316: 1977–1984
- 111 Choi D S, Kim D K, Kim Y K, et al. Proteomics, transcriptomics and lipidomics of exosomes and ectosomes. *Proteomics*, 2013, 13: 1554–1571
- 112 Crapnell K, Blaesus R, Hastings A, et al. Growth, differentiation capacity, and function of mesenchymal stem cells expanded in serum-free medium developed via combinatorial screening. *Exp Cell Res*, 2013, 319: 1409–1418
- 113 Barry F P, Murphy J M. Mesenchymal stem cells: clinical applications and biological characterization. *Int J Biochem Cell Biol*, 2004, 36: 568–584
- 114 Xin H, Li Y, Chopp M. Exosomes/miRNAs as mediating cell-based therapy of stroke. *Front Cell Neurosci*, 2014, 8: 377
- 115 Li Y, Liu Z, Xin H, et al. The role of astrocytes in mediating exogenous cell-based restorative therapy for stroke. *Glia*, 2014, 62: 1–16
- 116 Xin H, Li Y, Liu Z, et al. MiR-133b promotes neural plasticity and functional recovery after treatment of stroke with multipotent mesenchymal stromal cells in rats via transfer of exosome-enriched extracellular particles. *Stem Cells*, 2013, 31: 2737–2746
- 117 Oh M, Lee J, Kim Y J, et al. Exosomes derived from human induced pluripotent stem cells ameliorate the aging of skin fibroblasts. *Int J Mol Sci*, 2018, 19: 1715
- 118 Bae Y U, Son Y, Kim C H, et al. Embryonic stem cell-derived mmu-miR-291a-3p inhibits cellular senescence in human dermal fibroblasts through the TGF- β receptor 2 pathway. *Js Gerontol-Ser A*, 2019, 74: 1359–1367
- 119 Imai S I. The NAD World 2.0: the importance of the inter-tissue communication mediated by NAMPT/NAD⁺/SIRT1 in mammalian aging and longevity control. *npj Syst Biol Appl*, 2016, 2: 16018
- 120 Yoshida M, Satoh A, Lin J B, et al. Extracellular vesicle-contained eNAMPT delays aging and extends lifespan in mice. *Cell Metab*, 2019, 30: 329–342.e5
- 121 Lin J, Wang L, Lin J, et al. The role of extracellular vesicles in the pathogenesis, diagnosis, and treatment of osteoarthritis. *Molecules*, 2021, 26: 4987
- 122 Mulcahy L A, Pink R C, Carter D R F. Routes and mechanisms of extracellular vesicle uptake. *J ExtraCell Vesicles*, 2014, 3: 24641
- 123 Hu G, Drescher K M, Chen X M. Exosomal miRNAs: biological properties and therapeutic potential. *Front Gene*, 2012, 3
- 124 Tiscornia G, Izpisua Belmonte J C. MicroRNAs in embryonic stem cell function and fate. *Genes Dev*, 2010, 24: 2732–2741
- 125 Raimondo F, Morosi L, Chinello C, et al. Advances in membranous vesicle and exosome proteomics improving biological understanding and biomarker discovery. *Proteomics*, 2011, 11: 709–720
- 126 Akyurekli C, Le Y, Richardson R B, et al. A systematic review of preclinical studies on the therapeutic potential of mesenchymal stromal cell-derived microvesicles. *Stem Cell Rev Rep*, 2015, 11: 150–160
- 127 Zhang G, Zou X, Miao S, et al. The anti-oxidative role of micro-vesicles derived from human Wharton-Jelly mesenchymal stromal cells through NOX2/gp91(phox) suppression in alleviating renal ischemia-reperfusion injury in rats. *PLoS ONE*, 2014, 9: e92129
- 128 Yang J, Liu X X, Fan H, et al. Extracellular vesicles derived from bone marrow mesenchymal stem cells protect against experimental colitis via attenuating colon inflammation, oxidative stress and apoptosis. *PLoS ONE*, 2015, 10: e0140551
- 129 Yoon J, Jo W, Jeong D, et al. Generation of nanovesicles with sliced cellular membrane fragments for exogenous material delivery. *Biomaterials*, 2015, 59: 12–20
- 130 Vader P, Mol E A, Pasterkamp G, et al. Extracellular vesicles for drug delivery. *Adv Drug Deliver Rev*, 2016, 106: 148–156
- 131 Herrmann I K, Wood M J A, Fuhrmann G. Extracellular vesicles as a next-generation drug delivery platform. *Nat Nanotechnol*, 2021, 16: 748–759
- 132 Kalra H, Drummen G P C, Mathivanan S. Focus on extracellular vesicles: introducing the next small big thing. *Int J Mol Sci*, 2016, 17: 170
- 133 Pathan M, Fonseca P, Chitti S V, et al. Vesiclepedia 2019: a compendium of RNA, proteins, lipids and metabolites in extracellular vesicles. *Nucl Acids Res*, 2019, 47: D516–D519
- 134 Pulliam L, Sun B, Mustapic M, et al. Plasma neuronal exosomes serve as biomarkers of cognitive impairment in HIV infection and Alzheimer’s disease. *J Neurovirol*, 2019, 25: 702–709
- 135 Urabe F, Kosaka N, Ito K, et al. Extracellular vesicles as biomarkers and therapeutic targets for cancer. *Am J Physiol-Cell Physiol*, 2020, 318: C29–C39
- 136 Blennow K, Hampel H. CSF markers for incipient Alzheimer’s disease. *Lancet Neurol*, 2003, 2: 605–613

- 137 Rissman R A, Trojanowski J Q, Shaw L M, et al. Longitudinal plasma amyloid beta as a biomarker of Alzheimer's disease. *J Neural Transm*, 2012, 119: 843–850
- 138 Liu Z, Wang R, Lin H, et al. Lens regeneration in humans: using regenerative potential for tissue repairing. *Ann Transl Med*, 2020, 8: 1544
- 139 Wang R, Li J, Zhang X, et al. Extracellular vesicles promote epithelial-to-mesenchymal transition of lens epithelial cells under oxidative stress. *Exp Cell Res*, 2021, 398: 112362

Research progress in extracellular vesicles involved in redox balance during aging and regeneration

HUANG WeiMing¹, WANG RuiXin¹, ZHANG XiaYin¹, WANG Ting¹ & LIN HaoTian^{1,2,3}

1 State Key Laboratory of Ophthalmology, Zhongshan Ophthalmic Center, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510060, China;

2 Hainan Eye Hospital and Key Laboratory of Ophthalmology, Zhongshan Ophthalmic Center, Sun Yat-sen University, Haikou 570311, China;

3 Center for Precision Medicine, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510080, China

Extracellular vesicles (EVs) are mediators of intercellular communication involved in the regulation of many physiological and pathological processes. EVs are also potential biomarkers and therapeutic tools. However, it is necessary to study the molecular mechanism of exosome-related effects before clinical application. The balance of the redox system is not only related to the occurrence and progression of aging diseases but is also involved in the regulation of postinjury repair and tissue regeneration, which is the central link between aging and regeneration. EVs and the active biological components they carry are sensitive to senescence, regeneration, and oxidative stress. A change in EV contents or composition can trigger antioxidant and prooxidant reactions in target cells, thus regulating the redox balance. This paper summarizes the current consensus in EV research, reviews related studies on the participation of EVs in regulating redox balance in aging and regeneration-related pathological processes, and discusses the direction and prospects for future clinical applications of EVs.

extracellular vesicles, redox, aging diseases, regeneration

doi: [10.1360/SSV-2021-0174](https://doi.org/10.1360/SSV-2021-0174)