温敏型壳聚糖水凝胶包封外泌体在缺血性疾病中的应用

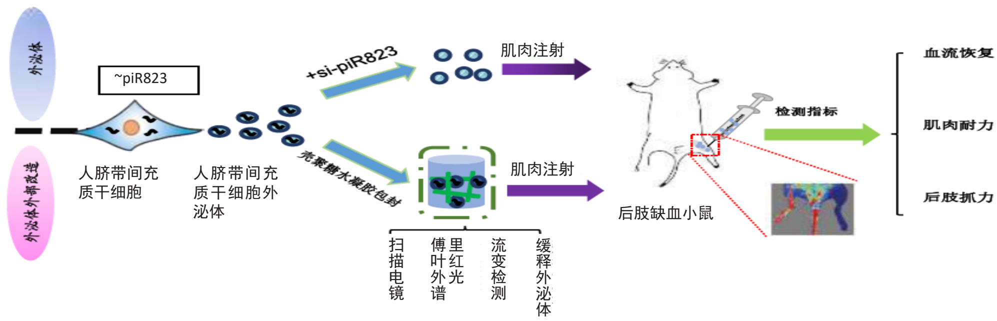
https://doi.org/10.3969/j.issn.2095-4344.3130
投稿日期：2020-07-15
送审日期：2020-07-17
采用日期：2020-08-11
在线日期：2020-10-14
中图分类号：
R459.9；R318.08；R654
文章编号：
2095-4344(2021)16-02479-09
文献标识码：A

刘 冯[1, 2]，张 瑜[1, 2]，王燕丽[1, 2]，骆 威[1, 2]，韩超珊[1, 2]，李杨欣[1, 2]

文章快速阅读：

文章特点—

△对外泌体进行修饰和改造，并用温度敏感型壳聚糖水凝胶包封外泌体，提高外泌体在体内的驻留率，从而改善其治疗效果。



文题释义：

壳聚糖水凝胶：一种具有高生物相容性的高分子材料，被广泛用作细胞和药物的载体。壳聚糖水凝胶交联细胞或药物并移植到损伤组织中后，可在原位提高细胞或药物的驻留率；此外，壳聚糖水凝胶可以模拟天然细胞外基质的环境，以促进细胞的黏附、迁移和增殖。

外泌体：直径为30-100 nm的细胞外囊泡。几乎所有的细胞均能释放外泌体，因此外泌体广泛存在于体液中。释放到细胞微环境中的外泌体可以通过膜融合、内吞或者信号转导的方式将其携带的内含物(如ncRNA)传递到邻近细胞或者远端细胞，促进细胞间信号交流。

摘要

背景：基于间充质干细胞来源的外泌体可减少心肌缺血和再灌注损伤，但存在半衰期短、清除速度快和靶向性低等问题。

目的：对外泌体进行修饰和改造，并用温敏型水凝胶包封外泌体，以提高外泌体在体内的驻留率，改善其治疗效果。

方法：利用细胞转染的方法敲低脐带间充质干细胞来源外泌体中的piR823，检测敲低piR823的外泌体对C2C12细胞增殖与凋亡的影响。制备壳聚糖/β-甘油磷酸钠温敏型水凝胶，将其与外泌体直接混合制备包封外泌体的壳聚糖/β-甘油磷酸钠温敏型水凝胶，检测包封外泌体后水凝胶的成胶性能、流变学及体外缓释性能。取30只C57BL/6J小鼠，建立后肢缺血模型，随机分5组干预：A组腓肠肌注射PBS，B组注射壳聚糖/β-甘油磷酸钠温敏型水凝胶，C组注射包封外泌体的壳聚糖/β-甘油磷酸钠温敏型水凝胶，D组注射外泌体，E组注射敲低piR823的外泌体，分别进行肢体功能与恢复、血流、四肢抓力、运动耐力及肌肉质量再生检测。

结果与结论：①敲低piR823的外泌体抑制C2C12细胞的增殖；正常外泌体抑制过氧化氢诱导的C2C12细胞凋亡，敲低piR823后外泌体的抑制细胞凋亡作用减弱；②包封外泌体的水凝胶具有成胶性能，但成胶时间缩短，其可缓慢持续释放外泌体达30 d以上；③后肢缺血28 d后，C组的左肢血流恢复优于B、D组($P < 0.05$)，D组优于E组($P < 0.05$)；C组的四肢抓力、运动耐力跑步时间和距离优于D、B组($P < 0.05$)，D组优于E组($P < 0.05$)；C组肌肉再生情况优于B、D组($P < 0.05$)，D组优于E组($P < 0.05$)；④结果表明，以壳聚糖/β-甘油磷酸钠温敏型水凝胶包封外泌体延长了外泌体在体内的滞留时间，明显增强了血流灌注及缺血后组织功能的恢复，治疗效果更显著。

关键词：材料；外泌体；壳聚糖；温敏型水凝胶；间充质干细胞；后肢缺血；动物模型；piRNA

Application of temperature-sensitive chitosan hydrogel encapsulated exosomes in ischemic diseases

Liu Feng[1, 2], Zhang Yu[1, 2], Wang Yanli[1, 2], Luo Wei[1, 2], Han Chaoshan[1, 2], Li Yangxin[1, 2]

[1]Institute of Cardiovascular Diseases, Medical College of Soochow University, Suzhou 215000, Jiangsu Province, China; [2]Department of Cardiovascular Surgery, First Affiliated Hospital of Soochow University, Suzhou 215006, Jiangsu Province, China

Liu Feng, Master candidate, Institute of Cardiovascular Diseases, Medical College of Soochow University, Suzhou 215000, Jiangsu Province, China; Department of Cardiovascular Surgery, First Affiliated Hospital of Soochow University, Suzhou 215006, Jiangsu Province, China

[1]苏州大学医学部心血管病研究所，江苏省苏州市 215000；[2]苏州大学附属第一医院心脏大血管外科，江苏省苏州市 215006

第一作者：刘冯，男，1995 年生，山东省临沂市人，汉族，苏州大学在读硕士，主要从事外泌体、非编码 RNA 及生物材料研究。

并列第一作者：张瑜，女，1990 年生，江苏省靖江市人，汉族，2015 年南京农业大学毕业，硕士，实验师，主要从事心血管疾病及其治疗研究。

通讯作者：李杨欣，博士，教授，苏州大学医学部心血管病研究所，江苏省苏州市 215000；苏州大学附属第一医院心脏大血管外科，江苏省苏州市 215006

https://orcid.org/0000-0002-2743-3856 (刘冯)

基金资助：国家自然科学基金重大研究计划项目 (91849122)，项目负责人：李杨欣；国家自然科学基金面上项目 (81870194)，项目负责人：李杨欣；江苏省“六大人才高峰”创新团队项目 (BU 24600117)，项目负责人：李杨欣

引用本文：刘冯，张瑜，王燕丽，骆威，韩超珊，李杨欣．温敏型壳聚糖水凝胶包封外泌体在缺血性疾病中的应用 [J]. 中国组织工程研究，2021，25(16):2479-2487.

Zhang Yu, Master, Experimentalist, Institute of Cardiovascular Diseases, Medical College of Soochow University, Suzhou 215000, Jiangsu Province, China; Department of Cardiovascular Surgery, First Affiliated Hospital of Soochow University, Suzhou 215006, Jiangsu Province, China
Liu Feng and Zhang Yu contributed equally to this article.
Corresponding author: Li Yangxin, PhD, Professor, Institute of Cardiovascular Diseases, Medical College of Soochow University, Suzhou 215000, Jiangsu Province, China; Department of Cardiovascular Surgery, First Affiliated Hospital of Soochow University, Suzhou 215006, Jiangsu Province, China

Abstract
BACKGROUND: Exosomes derived from mesenchymal stem cells can reduce myocardial ischemia and reperfusion injury, but there are some problems such as short half-life, fast clearance and low targeting.
OBJECTIVE: To modify and encapsulate exosomes with temperature-sensitive chitosan hydrogel to increase the retention rate of exosomes in the body, and to achieve better therapeutic effect.
METHODS: Cell transfection method was used to knock down piR823 in exosomes derived from umbilical cord mesenchymal stem cells, and the effect of knockdown of piR823 exosomes on the proliferation and apoptosis of C2C12 cells was detected. Chitosan/β-sodium glycerophosphate temperature-sensitive hydrogel was prepared and mixed directly with exosomes to prepare chitosan/β-sodium glycerophosphate temperature-sensitive hydrogel encapsulated with exosomes. The gel-forming properties, rheology and *in vitro* sustained release properties of the hydrogel after encapsulation of exosomes were tested. Thirty C57BL/6J mice were taken to establish hind limb ischemia models, and randomly divided into five groups. The gastrocnemius of group A was injected with PBS; group B was injected with chitosan/β-sodium glycerophosphate temperature-sensitive hydrogel; and group C was injected with exosomes-encapsulated chitosan/β-sodium glycerophosphate temperature-sensitive hydrogel; group D was injected with exosomes; group E was injected with exosomes knocking down piR823. Limb function and recovery, blood flow, grip strength, exercise endurance and muscle regeneration were detected in each group.
RESULTS AND CONCLUSION: (1) Exosomes knocking down piR823 inhibited the proliferation of C2C12 cells; normal exosomes inhibited hydrogen peroxide-induced apoptosis of C2C12 cells. The inhibitory effect of exosomes on apoptosis was weakened after piR823 was knocked down. (2) The hydrogel encapsulating exosomes had gel-forming properties, but the gel-forming time was shortened, and it could slowly and continuously release exosomes for more than 30 days. (3) After 28 days of hindlimb ischemia, the blood flow recovery of the left limb in group C was better than that in groups B and D ($P < 0.05$); it in group D was better than group E ($P < 0.05$); the grip strength, endurance, running time and distance of group C were better than those of groups D and B ($P < 0.05$), and above indexes in group D were better than in group E ($P < 0.05$). Muscle regeneration was better in group C than in groups B and D ($P < 0.05$), and it in group D was better than group E ($P < 0.05$). (4) The results showed that encapsulation of exosomes by chitosan/β-sodium glycerophosphate temperature-sensitive hydrogel prolonged the residence time of exosomes *in vivo*, significantly enhanced blood perfusion and recovery of tissue function after ischemia, and the treatment effect was more significant.
Key words: material; exosomes; chitosan; temperature-sensitive hydrogel; mesenchymal stem cells; hindlimb ischemia; animal model; piRNA

Funding: *Major Research Project of National Natural Science Foundation of China, No. 91849122 (to LYX); National Natural Science Foundation of China, 81870194 (to LYX); Jiangsu "Six Talents Peak" Innovation Team Project, No. BU 24600117 (to LYX)*
How to cite this article: *LIU F, ZHANG Y, WANG YL, LUO W, HAN CS, LI YX. Application of temperature-sensitive chitosan hydrogel encapsulated exosomes in ischemic diseases. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu. 2021;25(16):2479-2487.*

0 引言 Introduction

外周血管疾病的发病率近年明显上升 [1-2]，其中以动脉狭窄或闭塞为病理基础的下肢缺血性疾病是最常见的疾病之一，严重影响患者的健康和生活质量 [3-6]。骨髓、脂肪和脐带等多种组织来源的间充质干细胞在多种疾病和损伤中具有治疗潜力，如缺血性疾病、肾衰竭、皮肤损伤等 [7-9]，但间充质干细胞在损伤部位滞留时间短、存活率低是其在临床应用过程中面临的主要障碍 [10]。近年来，科研工作者提出“无细胞的干细胞治疗”，在功能上替代了干细胞，是一种新型的治疗方法 [11-13]。

外泌体就是“无细胞的干细胞治疗”的主要方式，其是由细胞分泌的直径在 30−100 nm 之间的脂质膜性囊泡，作为一种传递生物信息载体在免疫应答、细胞凋亡、血管生成、炎性反应等生理病理过程中均发挥一定作用 [14-15]。但是，基于间充质干细胞来源的外泌体治疗方法仍然面临许多问题与挑战，例如半衰期短、清除速度快和靶向性低 [16]。温敏型壳聚糖水凝胶、聚合物等具有高生物相容性的材料可作为载体递送细胞和药物，目前被广泛用于多种疾病的治疗 [17]。实验利用温敏型壳聚糖水凝胶包封外泌体，以期提高外泌体在体内的稳定性和驻留率，从而增强其治疗效果 [18]。

近年来的研究表明，非编码 RNA(non-coding RNA，ncRNA) 是重要的表观遗传调控因子，有助于治疗人类疾病，尤其是在癌症的发生和发展中 [19-20]。最近，一种独特的小型 ncRNA-Piwi 相互作用 RNA(简称 piRNA) 被发现可以调控 DNA 甲基化，随即引起了极大关注。piRNA 是含有 26−31 个核苷酸的 ncRNA，最早是 2006 年在哺乳动物系统中克隆与 Piwi 蛋白质相关的小 RNA 时发现的 [21-23]。piRNA 在外泌体中的表达具有差异性，外泌体中表达多种 piRNAs，其中包括 piR823[24]，就目前的研究现状而言，piR823 的研究相对比较多，是 ncRNA 中的“明星分子”之一。piR823 是 piRNA 家族中的成员，有 29 个核苷酸，研究表明其与肿瘤增殖能力密切相关。根据之前的报道，piR823 可以促进细胞增殖，因此作者推测 piR823 在外泌体中也发挥类似的作用，piR823 抑制剂的加入可以导致外泌体丧失部分功能，通过调控外泌体中 piR823 的表达可以治疗缺血导致的一些疾病。实验从人脐带间充质干细胞中分离出外泌体并抑制其内 piR823 的表达，进一步探究 piR823 在外泌体中的作用。因此，实验一方面旨在探究 piR823 在外泌体中发挥作用的具体机制；另一方面检测外泌体经壳聚糖水凝胶包封后是否可以提高在体内的滞留率和稳定性，从而提高其治疗效果。

1 材料和方法 Materials and methods

1.1 设计 随机对照动物实验。

1.2 时间及地点 实验于 2018 年 9 月至 2020 年 5 月在苏州大学医学部心血管病研究所完成。

1.3 材料 人脐带间充质干细胞购于江苏和泽生物科技有限公司；C2C12 细胞购于美国 ATCC 细胞库；piR823 的抑制剂 si-piR823 及引物由广州市锐博生物科技有限公司合成。

1.3.1 实验动物 8 周龄雄性 C57BL/6J 小鼠，用于构建后肢缺血模型，购于昭衍 (苏州) 新药研究中心有限公司，许可证号：SCXK(苏)2018−0006，饲养于苏州大学实验动物中心。

1.3.2 主要试剂 β− 甘油磷酸钠 (Sigma，美国)；壳聚糖 (浙江

金壳药业股份有限公司)；外泌体分离试剂盒 (Life Technology，美国)；Annexin V-FITC 凋亡检测试剂盒 (BD，荷兰)；Cell-LightTM Apollo 567 Stain Kit(锐博生物)。

1.4 实验方法

1.4.1 外泌体的获取及鉴定 将胎牛血清 100 000 ×*g* 离心 7 h，以去除先前存在于其中的外泌体。将人脐带间充质干细胞用含有体积分数 10% 胎牛血清的培养基培养。培养 48 h 后，使用外泌体分离试剂盒分离外泌体，将人脐带间充质干细胞的培养基以 2 000×*g* 离心 30 min 以除去死细胞和碎片；吸取上清，与外泌体分离试剂以体积比 2 ∶ 1 加入到新试管中，4 ℃下孵育过夜；次日，4 ℃下以 10 000×*g* 离心 1 h，沉淀即为分离得到的外泌体。

电子显微镜观察：将外泌体质量浓度调整到 0.5 g/L，PBS 重悬，加入 2.5% 戊二醛固定 10 min，取 20–30 μL 固定好的外泌体悬液滴于碳膜包被的铜网上并于室温静置 1 min，红外灯下烘干 5 min，滴加一滴 1% 磷酸钨酸于铜网上室温染色 5 min，吸干磷酸钨酸溶液，再次置于红外灯下烘干 10 min。最后将铜网置于电子显微镜下，进行观察并成像。

纳米粒度分析：将外泌体质量浓度调整到 1 g/L(用量为 1 mL)，随后使用纳米粒度及 Zeta 电位分析仪进行测量。

流式细胞术鉴定：取 10 μL 外泌体悬液到 1.5 mL EP 管中，加入 10 μL 醛 / 硫酸盐乳胶微珠室温孵育 15 min。随后向 EP 管中加入 PBS 至总体积为 1 mL，混匀后室温孵育 2 h。2 h 后，加入 1 mol/L 的甘氨酸溶液 110 μL，混匀后室温孵育 30 min。4 000 r/min 离心 3 min，弃上清。用含 0.5%BSA 的 PBS 洗涤 2 次外泌体沉淀。100 μL 含 0.5%BSA 的 PBS 重悬外泌体，加入 10 μL FITC 标记的 CD63 抗体，4 ℃避光孵育 1 h。通过 0.5%BSA 的 PBS 洗涤外泌体沉淀 2 次，最后用 200 μL 含 0.5%BSA 的 PBS 重悬，上机检测。

1.4.2 piR823 改造和修饰外泌体 采用细胞转染的方法敲低外泌体中的 piR823，具体如下：待间充质干细胞密度达到 60%–80% 时即可进行转染实验，首先将旧的培养基吸出，每孔加入 1 mL PBS，冲洗，吸出后每孔加入 4 mL 基础培养基 (无双抗)，30 min 后开始转染；配制 A 液：475 μL 基础培养基 +25 μL Lip2000，B 液：475 μL 基础培养基 +25 μL piR823 inhibitor；室温条件下混匀 A 液和 B 液，孵育 15 min；然后加入到培养皿中，此时每个培养皿的终体积为 5 mL。6 h 后转为无外泌体血清的培养基 (αMEM 基础培养基 + 通过离心去除外泌体的血清)，待细胞长满时即可收集外泌体，此时得到的外泌体即为转染后的外泌体。采用相同方法转染转染 piR823 的空白对照。利用 qRT-PCR 法检测 piR823 mRNA 的表达量。

为了探究 piR823 在人脐带间充质干细胞来源外泌体中的作用，检测小鼠各器官中 piR823 mRNA 的表达量，以及外泌体及其来源人脐带间充质干细胞中 piR823 mRNA 的表达量。

qRT-PCR 检测 piR823 mRNA 表达量：将组织样品先进行研磨后加入 Trizol 裂解液提取 RNA，细胞及外泌体样品直接加入 Trizol 裂解液裂解提取 RNA。根据 PrimeScript RT 试剂盒 (TaKaRa，日本) 对 RNA 进行反转录，具体反应体系：5×PrimeScript Buffer 2 μL，PrimeScript Enzyme mTX 0.5 μL，Oligo dT Primer(50 μmol/L)0.5 μL，Random primers(100 μmol/L)0.5 μL，Total RNA 500 ng，RNAase Free ddH_2O 补齐至 10 μL；反应程序：16 ℃ 30 min，30 ℃ 30 s，42 ℃ 30 s，50 ℃ 1 s，85 ℃ 5 s，10 ℃ hold。采用 SYBR Premix Ex Taq 试剂盒对 cDNA 样品进行 qRT-PCR 检测，反应体系：SYBR Premix Ex Taq 5 μL，Forward Primer(5 μmol/L) 0.4 μL，Reverse Primer(5 μmol/L)0.4 μL，ROX Reference Dye 0.2 μL，cDNA 模板 2 μL，RNAase Free ddH_2O 2 μL；反应程序：95 ℃ 1 min，95 ℃ 2 s，60 ℃ 30 s，95 ℃ 15 s，60 ℃ 1 s。piR823 引物序列：AGC GUU GGU GGU AUA GUG GUG AGC AUA GCU GC。

1.4.3 细胞增殖实验 将处于对数生长期、生长状态良好的 C2C12 细胞均匀接种于 96 孔板中，培养至正常生长阶段，待细胞密度达到 85% 以上时即可进行实验，以每孔 $4×10^3$–$1×10^5$ 个细胞为宜。将 C2C12 细胞均匀铺到 96 孔板中，12 h 后在培养基内分别加入转染 piR823 抑制剂的外泌体和转染空白对照的外泌体，两者质量浓度均为 100 g/L。培养 24 h 后，按照锐博生物 Cell-Light^{TM} Apollo 567 Stain Kit 使用说明进行实验，依次进行 EdU 标记、细胞固定化、Apollo 染色和 DNA 染色，最后进行图像获取及分析，染色完成后马上进行检测；如果条件限制，应在 4 ℃避光条件下保存，但不应超过 3 d。

1.4.4 细胞凋亡实验 取对数生长期的 C2C12 细胞，待细胞密度达到 75%–80% 时，将细胞培养基分别换成含 50，100，200 μmol/L 过氧化氢的培养基处理 24 h，建立体外细胞凋亡模型。24 h 后，通过 qRT-PCR 检测细胞内 piR823 mRNA 的表达情况。为进一步检测外泌体及其中 piR823 对体外细胞凋亡的影响，将对数生长期的 C2C12 细胞分为 3 组，分别为过氧化氢处理组、过氧化氢 + 外泌体组、过氧化氢 + 敲低 piR823 外泌体组，过氧化氢浓度均为 100 μmol/L，外泌体的质量终浓度均为 100 g/L，处理 24 h，最后用流式细胞术检测凋亡情况。

1.4.5 外泌体对壳聚糖 /β- 甘油磷酸钠温敏型水凝胶的影响实验

壳聚糖 /β- 甘油磷酸钠温敏型水凝胶制备：称取 2.8 g β- 甘油磷酸钠溶解于 5 mL 去离子水中，使其质量浓度为 560 g/L；将脱乙酰度为 95% 的壳聚糖粉末 (脱乙酰度 > 95%)0.2 g 溶解于 10 mL 的 0.1 mol/L 醋酸溶液中，使其质量浓度为 22 g/L，于 25 ℃搅拌过夜至完全溶解，以 100 μm 细胞筛过滤，除去杂质。取壳聚糖乙酸溶液 10 mL 于小烧杯中，在冰水浴条件下按照 10 ∶ 1 比例逐滴添加 1 mL 的 β- 甘油磷酸钠溶液，并不断搅拌。用饱和的磷酸氢钠溶液调节 pH 值至 6.96。将上述配置好的溶液置于 37 ℃恒温水浴锅中，待溶液不流动时，即形成壳聚糖 /β- 甘油磷酸钠温敏型水凝胶。

温敏型水凝胶包封外泌体：在温敏型水凝胶成胶前与外

泌体直接混合，保证外泌体的质量浓度为 100 g/L。

温敏型水凝胶的成胶性能：将配制好的壳聚糖 /β- 甘油磷酸钠温敏型水凝胶溶液通过皮下分别注入 4 只小鼠体内，注射量为 100 μL，15 min 后剪开小鼠皮肤，如发现产生胶冻样物质，证明可在小鼠体内成胶。

酶标仪检测：取壳聚糖溶液、壳聚糖溶液 + 外泌体、壳聚糖 /β- 甘油磷酸钠温敏型水凝胶、壳聚糖 /β- 甘油磷酸钠温敏型水凝胶 + 外泌体各 100 μL，放入 96 孔板中，每组 3 孔。设置 450，562，695 nm 3 个波长，利用酶标仪进行吸光度值检测。

扫描电镜检测：首先将冷冻干燥的样品黏附在扫描电镜底座的导电胶带上，待离子溅射仪镀膜后入扫描电镜观察。

傅里叶红外光谱检测：将壳聚糖溶液、壳聚糖溶液 + 外泌体、壳聚糖 /β- 甘油磷酸钠温敏型水凝胶、壳聚糖 /β- 甘油磷酸钠温敏型水凝胶 + 外泌体置于 -20 ℃冷冻，待完全凝固后放到冷冻干燥仪中进行冷冻干燥。待完全冻干后取出适量，随后使用 VERTEX70 红外光谱仪 (Thermo Fisher，美国) 进行检测。首先将仪器预热 30 min，然后将样品取出，放于样品检测台中间的光源透过处，最后进行 ATR 光谱测量 (测量时样品一定要压紧)。

流变学测量：取壳聚糖 /β- 甘油磷酸钠温敏型水凝胶与包封外泌体的壳聚糖 /β- 甘油磷酸钠温敏型水凝胶，运用振荡模式，固定频率 1 Hz、应变振幅 0.01%，温度范围 0-40 ℃，升温速率 1 ℃ /min，平衡 3 min 后对样品进行温度扫描，考察 G′ (储能模量)、G″ (耗能模量) 随温度的变化关系。

水凝胶包封外泌体的缓释动力学：为了检测温敏型水凝胶释放外泌体的速率，使用 PKH26 荧光染料试剂对外泌体进行荧光标记，将包封外泌体的水凝胶置于 24 孔板内，用 1 mL PBS 浸泡。在 37 ℃下每 2 d 收集一次降解液，并加入新的 PBS，最后使用流式细胞仪 (Millipore 德国) 检测不同时间收集的外泌体的量。将浸泡 30 d 的缓释液与 C2C12 细胞共孵育，24 h 后通过 EdU 试剂检测 PBS 及缓释液对细胞的影响。

1.4.6 不同修饰和改造的外泌体对小鼠缺血后肢恢复的影响

小鼠后肢缺血模型的建立：将 30 只小鼠随机分为 5 组，每组 6 只。首先，使用 4% 水合氯醛进行腹腔注射，待小鼠麻醉后将其仰卧固定。用脱毛膏对两条后肢脱毛，并用体积分数 75% 乙醇棉球对皮肤消毒。纵行切开左后肢正中的皮肤，从腹股沟开始，沿腹股沟韧带向远端钝性剥离肌肉至膝关节，分离出股动脉，在腹股沟韧带下结扎股动脉，并结扎与股动脉相连的所有分支。手术结束后，从中间偏下端的位置剪断股动脉，以不出血初步鉴定为建模成功。随后向小鼠的左后肢腓肠肌分别注射 PBS(A 组)、壳聚糖 /β- 甘油磷酸钠温敏型水凝胶 (B 组)、包封外泌体的壳聚糖 /β- 甘油磷酸钠温敏型水凝胶 (C 组)、外泌体 (D 组)、敲低 piR823 的外泌体 (E 组)，每组试剂 60 μL，最后缝合伤口。

qRT-PCR 检测：后肢缺血 0，1，3，7 d 后，利用 qRT-PCR 检测缺血组织 piR823 mRNA 表达量。

激光多普勒血流仪实验：术后 0，7，14，21 及 28 d，通过激光多普勒血流仪对小鼠后肢血流灌注情况进行检测。建模当天血流灌注率低于 15% 为建模成功。首先通过小动物呼吸麻醉机对小鼠进行麻醉 (2% 异氟烷)，之后用脱毛膏对小鼠的双后肢进行脱毛处理，并用激光多普勒血流仪检测小鼠后肢血流。具体操作是：在室温下分别于小鼠手术侧和非手术侧的后肢放置激光探头，扫描测量后肢血流 (在放松、恒温下所测得的数值)。灌注平均值根据储存的数字彩色编码图像进行计算，灌注率为缺血左肢血流 / 正常右肢血流。

运动耐力实验：术后 28 d 进行运动耐力实验。先将小鼠置于跑步机上低速运动 1 h 以适应周围环境，1 h 后当小鼠在跑步机上处于稳定运动状态时开始记录跑步时间与距离。首先将跑步机的初始速度设定为 6 m/min，之后再将跑步机速度匀速增加至 18 m/min 并保持不变，直至小鼠处于完全疲惫状态。最终，记录小鼠运动最终总距离与时间。

抓力实验：术后 28 d，通过小鼠抓力仪对小鼠四肢力量进行评估测量。首先是将小鼠轻轻放置在抓力板上，抓住鼠尾轻轻向后牵拉 (不可猛拉)，待动物抓牢抓力板后，均匀用力后拉致使动物松爪，仪器会自动记录小鼠的最大抓力。每只小鼠测量 10 次，去掉最大值和最小值，取剩余数值的平均值作为最终测量结果值。

肢体运动功能与恢复评分：根据国际通用的半定量评分系统对小鼠肢体功能与恢复进行评分，具体评分参照标准见**表 1**。

表 1 | 肢体运动功能与恢复评分
Table 1 | **Limb motor function and recovery score**

分数	肢体运动功能	肢体恢复情况
1	无后肢无脚趾，后肢完全坏死并脱落	肢体完全坏死脱落
2	有后肢，无脚掌，后肢出现坏死但未完全脱落	出现坏死，但仅脚掌脱落
3	有后肢，脚掌存在，无脚趾	出现坏死，仅脚趾脱落
4	有后肢，脚掌存在，有脚趾，但脚趾不能使用	出现坏死，但仅脚指甲损伤
5	后肢运动不受限制	完全恢复

肌肉质量比实验：在术后 30 d 处死小鼠，称量小鼠体质量，再取出小鼠缺血后肢腓肠肌称质量，以获得其肌肉质量比。

1.5 主要观察指标　敲低 piR823 的外泌体对 C2C12 细胞增殖与凋亡的影响；外泌体与壳聚糖 /β- 甘油磷酸钠温敏型水凝胶的相互作用；外泌体及敲低 piR823 的外泌体小鼠缺血后肢恢复的影响。

1.6 统计学分析　采用 GraphPad 7.0 软件进行统计分析，计量资料用 $\bar{x}\pm s$ 表示，多组间比较采用单因素方差分析，各组间两两比较采用 t 检验，$P < 0.05$ 为差异有显著性意义。

2 结果 Results

2.1 外泌体的鉴定　电子显微镜显示，人脐带间充质干细胞来源外泌体的直径在 60 nm 左右，为具有典型杯状形态的圆形颗粒，见**图 1A**。纳米粒度分析仪结果显示，外泌体的直径分布为 30-100 nm，见**图 1B**。表明分离得到的外泌体符

合要求，可进行后续实验。流式细胞术结果显示，外泌体中 $CD63^+$ 含量高达 99.9%，见图 **1C**，说明分离得到为外泌体。

2.2 piR823 改造和修饰外泌体及相关检测 qRT-PCR 检测结果显示，转染 piR823 抑制剂后外泌体中的 piR823 mRNA 表达量下降，见图 **2A**；在各器官中，脾中的 piR823 mRNA 表达量最高，心脏和左肢次之，见图 **2B**；外泌体中的 piR823 mRNA 表达量高于脐带间充质干细胞 (P < 0.001)，见图 **2C**。

2.3 细胞增殖检测结果 将正常的外泌体及敲低 piR823 的外泌体与细胞共孵育并进行 EdU 染色，发现与正常的外泌体相比，敲低 piR823 的外泌体抑制了细胞增殖，见图 **3**。

2.4 细胞凋亡检测结果 与正常培养的细胞相比，经不同浓度过氧化氢处理后细胞内的 piR823 mRNA 表达量下降 (P < 0.01)，见图 **4A**。凋亡试剂盒检测结果显示，过氧化氢组活细胞和早期凋亡细胞比例分别为 13.37%，62.7%，过氧化氢 + 外泌体组活细胞和早期凋亡细胞比例分别为 42.97%，47.63%，过氧化氢 + 敲低 piR823 外泌体组活细胞和早期凋亡细胞比例分别为 34.57%，50.27%，说明外泌体可有效减少细胞凋亡，而敲低 piR823 一定程度地抑制了外泌体的抗凋亡作用，见图 **4B**。

2.5 外泌体对壳聚糖 /β- 甘油磷酸钠温敏型水凝胶的影响 4 ℃下，壳聚糖 /β- 甘油磷酸钠温敏型水凝胶呈现为无色透明的液体，流动性好，pH 值为 6.8-7.2，并且在室温条件下可长时间保持液态。37 ℃下，短时间内发生交联反应，变为固态胶冻样凝胶，见图 **5A**。将壳聚糖 /β- 甘油磷酸钠温敏型水凝胶通过皮下注入小鼠体内，15 min 后剪开小鼠皮肤发现产生胶冻样物质，证明可在小鼠体内成胶，见图 **5B**。为了探究外泌体对温敏型水凝胶成胶的影响，通过直观观察及用酶标仪进行吸光度值检测，发现在 3 个不同波长下壳聚糖溶液的吸光度值最低，加入外泌体后吸光度均增加，待温敏型水凝胶形成后吸光度值均进一步增加，见图 **5C**，**D**。

扫描电镜显示，壳聚糖 /β- 甘油磷酸钠温敏型水凝胶的直径为 50-100 μm，加入外泌体后直径略微增大，见图 **6A**，**B**。傅里叶红外光谱检测结果显示，壳聚糖 /β- 甘油磷酸钠水凝胶原本位于 1 567.33 cm^{-1} 的吸收峰，在加入外泌体后蓝移至 1 573.64 cm^{-1} 处，见图 **6C**。外泌体加入后并未引起显著变化，原因可能是外泌体与材料的基团发生作用降低了氢键作用，从而引起波数的轻微变化，进一步说明外泌体并未对温敏型水凝胶产生很大的影响，为温敏型水凝胶包封外泌体提供了基础。

流变学检测结果表明，壳聚糖 /β- 甘油磷酸钠温敏型水凝胶中的储存模量大于损耗模量，且加入外泌体后储存模量仍然大于损耗模量，同时缩短了温敏型水凝胶的成胶时间，见图 **6D**，**E**。这说明加入外泌体后可以促进壳聚糖 /β- 甘油磷酸钠温敏型水凝胶的成胶，这也与傅里叶红外光谱的结果相一致。

因为壳聚糖 /β- 甘油磷酸钠温敏型水凝胶形成的孔径为 50-120 μm，外泌体直径在 30-100 nm，所以理论上外泌体的释放应快于水凝胶的降解速率。通过流式细胞仪检测不同时间收集的外泌体的量，计算外泌体累积的释放比例，结果表明 PKH26 标记的外泌体在第 2 天开始释放，在 6-10 d 快速释放，并达到最大释放量，见图 **6F**。

将收集到的滤液与 C2C12 细胞共孵育，24 h 后通过 EdU 试剂检测空白对照 PBS 及缓释液对细胞的影响，结果显示相较于 PBS 对照组，缓释液组 EdU 阳性细胞数量显著增加 (P < 0.05)，见图 **6G**，**H**，表明外泌体可以从壳聚糖 /β- 甘油磷酸钠温敏型水凝胶缓释，并促进细胞增殖。

2.6 不同修饰和改造的外泌体对小鼠缺血后肢恢复的影响 在小鼠后肢缺血后的 piR823 mRNA 表达量变化见图 **7** 所示，piR823 mRNA 表达量在缺血组织中显著降低。建模不同时间点的多普勒血流检测见图 **8** 所示，C 组左肢血流恢复优于 B、D 组 (P < 0.01)，D 组优于 E 组 (P < 0.001)。这说明温敏型水凝胶包封外泌体延长了外泌体在组织内的滞留时间，提高了其治疗效果；同时 piR823 在外泌体中发挥重要作用，抑制其表达后小鼠左肢血流的恢复效果差于正常外泌体组。

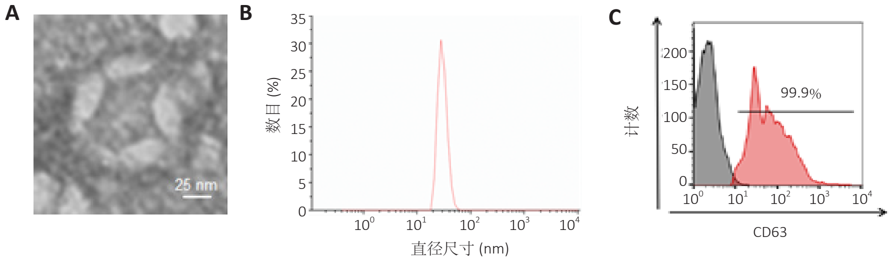
5 组小鼠的肢体运动功能及恢复情况见图 **9**，不管是运动功能还是肢体恢复情况，C 组都恢复的最好。各组小鼠四肢抓力大小、肌肉质量比及达到力竭状态时运动的最远路程与最长时间，见图 **10** 所示，C 组的四肢抓力、运动耐力跑步时间和距离优于 D、B 组，D 组优于 E 组；C 组肌肉再生情况优于 B、D 组 (P < 0.001)，D 组优于 E 组 (P < 0.01)，证明了 piR823 在外泌体中发挥重要作用，抑制其表达将影响小鼠的肢体恢复。

3 讨论 Discussion

此次实验发现，外泌体经壳聚糖水凝胶包封后可以提高在体内的滞留率和稳定性，从而增强外泌体的治疗效果，实验还探究了 piR823 在外泌体中的生物学作用，发现敲低外泌体中 piR823 的含量会减弱外泌体的治疗效果。

piRNA 是一种新型的 ncRNA，最近被发现参与疾病的发生 [23]。piRNA 主要来源于含有大量转座子和重复序列的基因间区，又称之为 piRNA 簇，其长度为 23-31 nt，5 端首位通常为单磷酸的尿嘧啶核糖核酸，3 端进行了甲基化修饰，通常与 Ago 蛋白家族的 Piwi 亚家族蛋白相互结合共同行使功能 [25-27]。外泌体中表达几种 piRNAs，其中包括 piR823。此次实验发现，间充质干细胞来源的外泌体中也有 piR823[24]，并且 piR823 抑制剂的加入可以导致外泌体丧失部分功能，与正常的外泌体相比，抑制 piR823 表达外泌体的促细胞增殖及小鼠肢体恢复能力明显减弱，这不仅与之前的报道一致，即 piR823 可以促进细胞增殖 [27-30]，还提示通过调控 piR823 可能治疗缺血导致的一些疾病。

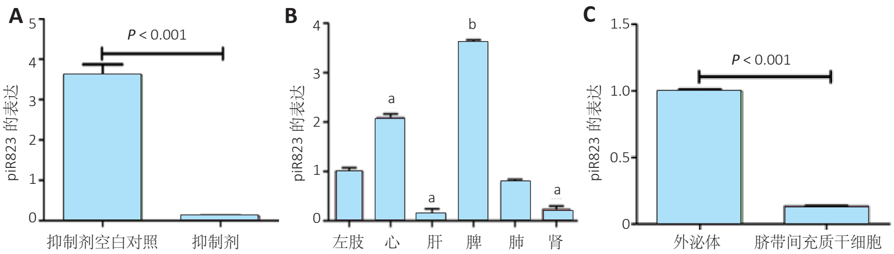
许多研究表明，间充质干细胞的治疗益处主要是由于它们在移植后介导的旁分泌作用。外泌体作为一种主要的旁分泌物质，已被证实是生理和病理过程中细胞间通讯的重要媒



图注：A 为电子显微镜图像，外泌体的直径在 60 nm 左右，为具有典型杯状形态的圆形颗粒；B 为纳米粒度分析，外泌体的直径分布为 30–100 nm；C 为流式细胞术分析结果，外泌体中 $CD63^+$ 含量高达 99.9%

图 1 | 人脐带间充质干细胞来源外泌体的鉴定

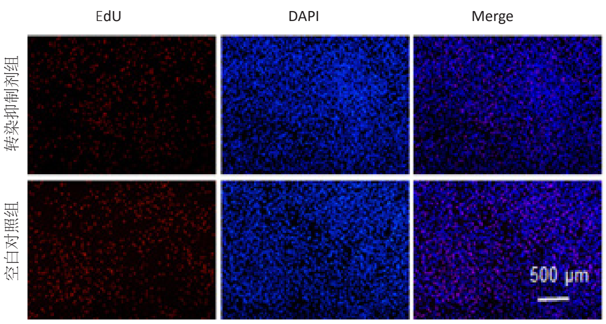
Figure 1 | Identification of exosomes derived from human umbilical cord mesenchymal stem cells



图注：A 为转染 piR823 抑制剂后外泌体的 piR823 mRNA 表达量；B 为小鼠各器官中 piR823 mRNA 表达量，与左肢比较，$^aP < 0.01$，$^bP < 0.001$；C 为外泌体与脐带间充质干细胞中的 piR823 mRNA 表达量

图 2 | piR823 改造和修饰外泌体及相关检测

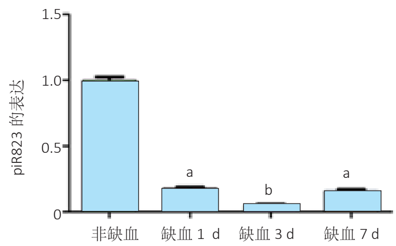
Figure 2 | piR823-modified exosomes and related detection



图注：红色标记的为增殖细胞。与正常的外泌体相比，敲低 piR823 的外泌体抑制了细胞增殖

图 3 | 敲低 piR823 的外泌体对 C2C12 细胞增殖的影响

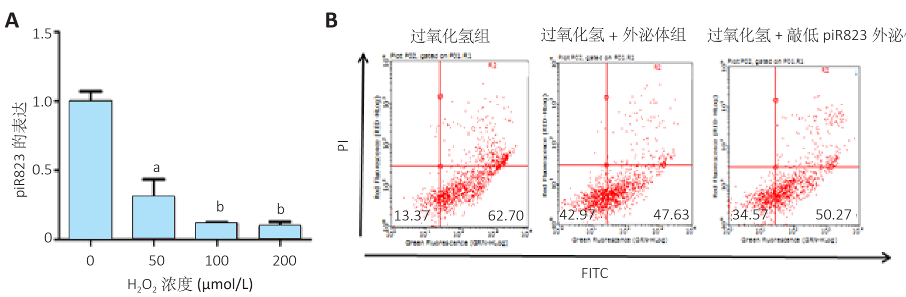
Figure 3 | Effect of exosomes knocking down piR823 on the proliferation of C2C12 cells



图注：与非缺血比较，$^aP < 0.01$，$^bP < 0.001$

图 7 | 小鼠后肢缺血后 piR823 mRNA 表达量

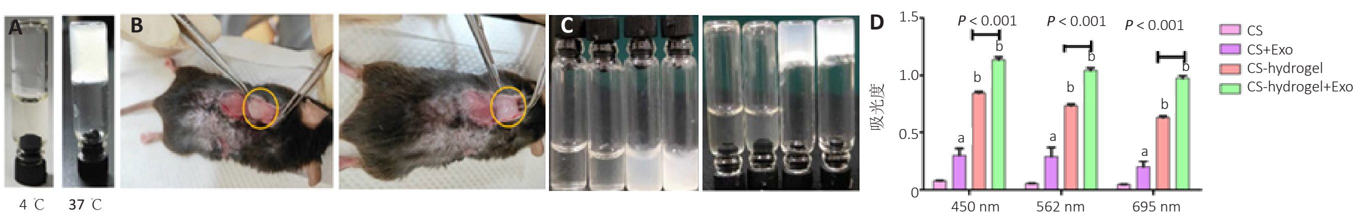
Figure 7 | piR823 mRNA expression after hindlimb ischemia in mice



图注：A 为细胞内 piR823 mRNA 表达，与 0 μmol/L H_2O_2 比较，$^aP < 0.01$，$^bP < 0.001$；B 为活细胞和早期凋亡细胞比例检测

图 4 | 敲低 piR823 的外泌体对 C2C12 细胞凋亡的影响

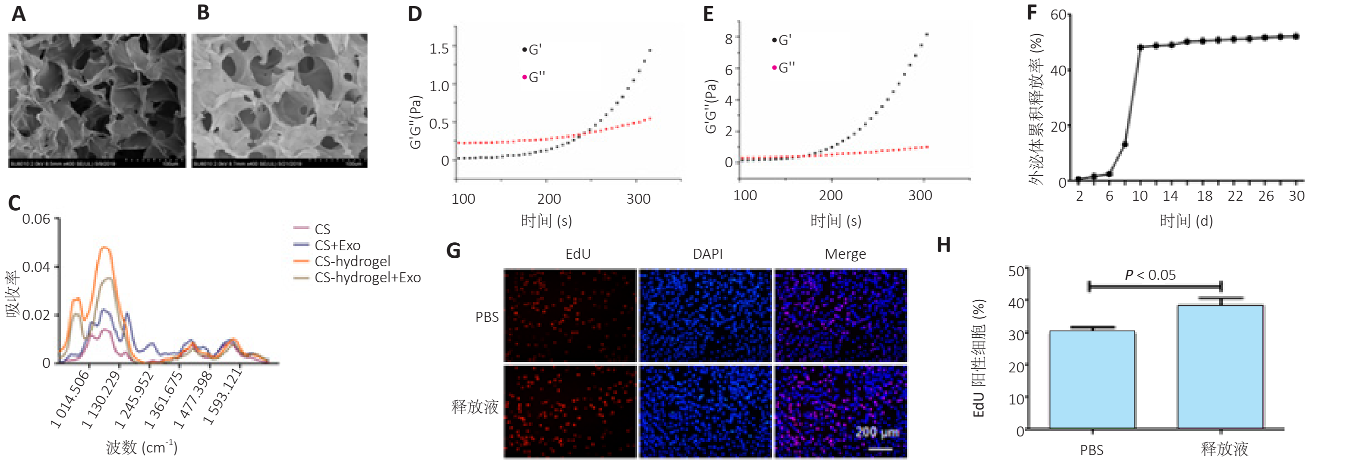
Figure 4 | Effect of exosomes knocking down piR823 on the apoptosis of C2C12 cells



图注：A 为不同温度下水凝胶的状态；B 为小鼠皮下水凝胶溶液成胶；C 为不同物质的大体状态变化，从左至右分别为壳聚糖溶液、壳聚糖溶液 + 外泌体、壳聚糖 /β- 甘油磷酸钠温敏型水凝胶、壳聚糖 /β- 甘油磷酸钠温敏型水凝胶 + 外泌体；D 为不同波长下不同物质吸光度值的变化，CS、CS+Exo、CS-hydrogel、CS-hydrogel+Exo 分别代表壳聚糖溶液、壳聚糖溶液 + 外泌体、壳聚糖 /β- 甘油磷酸钠温敏型水凝胶、壳聚糖 /β- 甘油磷酸钠温敏型水凝胶 + 外泌体，与壳聚糖溶液比较，$^aP < 0.01$，$^bP < 0.001$

图 5 | 壳聚糖 /β- 甘油磷酸钠温敏型水凝胶的理化特性及外泌体的影响

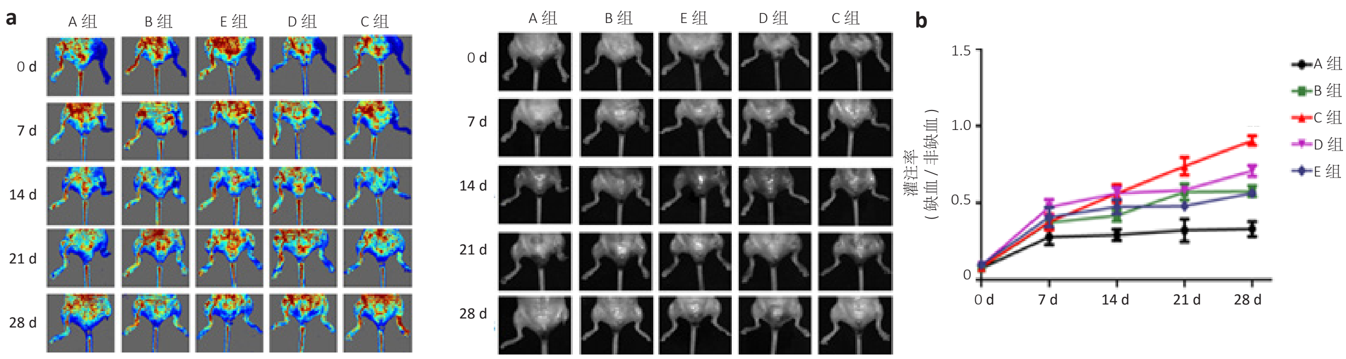
Figure 5 | Physical and chemical properties of chitosan/β-sodium glycerophosphate temperature-sensitive hydrogel and effect of exosomes



图注：A 为温敏型水凝胶的扫描电镜图像 (×400)；B 为温敏型水凝胶 + 外泌体的扫描电镜图像 (×400)；C 为不同物质的红外光谱分析，CS、CS+Exo、CS-hydrogel、CS-hydrogel+Exo 分别代表壳聚糖溶液、壳聚糖溶液 + 外泌体、壳聚糖 /β- 甘油磷酸钠温敏型水凝胶、壳聚糖 /β- 甘油磷酸钠温敏型水凝胶 + 外泌体；D 为温敏型水凝胶的流变性检测；E 为包封外泌体温敏型水凝胶的流变性检测；F 为包封外泌体温敏型水凝胶的体外缓释；G 为 EdU 检测缓释液对 C2C12 细胞的影响；H 为 EdU 阳性细胞比例统计结果

图 6 | 外泌体对壳聚糖 /β- 甘油磷酸钠温敏型水凝胶的影响

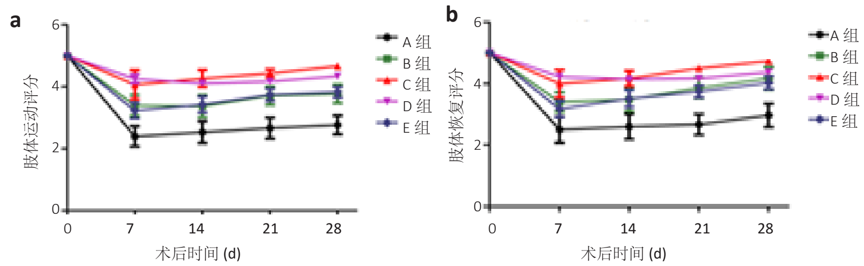
Figure 6 | **Effect of exosomes on chitosan/β-sodium glycerophosphate temperature-sensitive hydrogel**



图注：A 组注射 PBS，B 组注射壳聚糖 /β- 甘油磷酸钠温敏型水凝胶，C 组注射包封外泌体的壳聚糖 /β- 甘油磷酸钠温敏型水凝胶，D 组注射外泌体，E 组注射敲低 piR823 的外泌体。a 为激光多普勒血流仪检测肢体形态及血流恢复情况；b 为各组小鼠缺血后肢血流恢复统计，28 d 后，C 组灌注率优于 D 组 ($P < 0.01$)，D 组优于 A 组 ($P < 0.01$)、E 组 ($P < 0.001$)

图 8 | 术后不同时间点各组小鼠多普勒血流检测结果

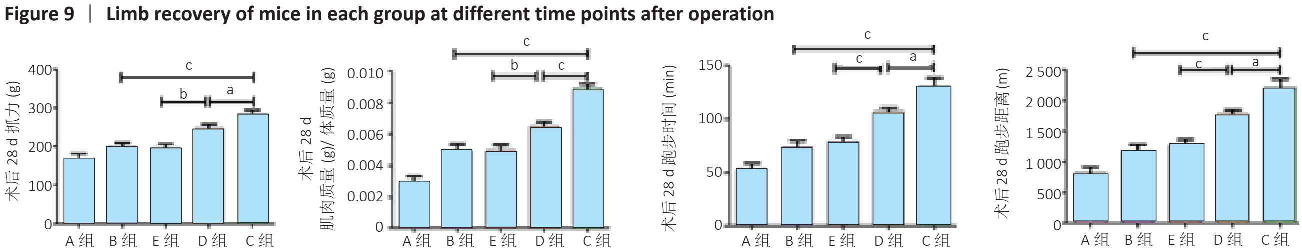
Figure 8 | **Doppler blood flow test results of each group of mice at different time points after surgery**



图注：A 组注射 PBS，B 组注射壳聚糖 /β- 甘油磷酸钠温敏型水凝胶，C 组注射包封外泌体的壳聚糖 /β- 甘油磷酸钠温敏型水凝胶，D 组注射外泌体，E 组注射敲低 piR823 的外泌体。a 为肢体运动功能评分，28 d 后，C 组肢体运动功能恢复优于 D 组 ($P < 0.05$)，D 组优于 A、E 组 ($P < 0.05$)；b 为肢体恢复功能评分，28 d 后，C 组肢体恢复优于 D 组 ($P < 0.01$)，D 组优于 A 组 ($P < 0.000\ 1$)、E 组 ($P < 0.05$)

图 9 | 术后不同时间点各组小鼠肢体恢复情况

Figure 9 | **Limb recovery of mice in each group at different time points after operation**



图注：A 组注射 PBS，B 组注射壳聚糖 /β- 甘油磷酸钠温敏型水凝胶，C 组注射包封外泌体的壳聚糖 /β- 甘油磷酸钠温敏型水凝胶，D 组注射外泌体，E 组注射敲低 piR823 的外泌体。从左至右依次为四肢抓力检测结果、肌肉质量比检测结果、运动耐力实验跑步时间检测结果、运动耐力实验跑步距离检测结果。$^aP < 0.05$，$^bP < 0.01$，$^cP < 0.001$

图 10 | 术后 28 d 各组小鼠四肢抓力、肌肉质量比及运动耐力检测结果

Figure 10 | **Test results of limb grip strength, muscle mass ratio and exercise endurance of mice in each group at 28 days after operation**

介[31]。外泌体被包裹在脂质双分子层中，当多囊泡融合到质膜时从供体细胞中释放出来，这种独特的起源使外泌体可以从供体细胞中转移特定物质 (包括蛋白质、ncRNA) 到受体细胞[32-33]。最近越来越多的研究表明，源自间充质干细胞的外泌体具有与间充质干细胞相似的潜在治疗功能[34]，并被证明可减少心肌缺血和再灌注损伤[33-35]。外泌体的缺点是注射后由于缺乏支持基质体内游离的外泌体不可避免地被快速清除，从而无法高效地发挥治疗效果，这也是在临床中使用外泌体治疗的主要挑战。一些策略已经用于改善和提高外泌体的功能，如调节供体细胞的微环境以提高外泌体的滞留率[36-37]。此次实验直接修饰外泌体，即借助温度敏感型壳聚糖水凝胶来提高外泌体在缺血组织的滞留率，从而有效提高外泌体的功能。

水凝胶已被广泛用于组织的生物医学研究工程、药物输送和基于细胞的治疗[38-40]。壳聚糖 /β- 甘油磷酸钠温敏型水凝胶由于其温度敏感性而成为有吸引力的生物材料，其温度敏感性体现在室温或低于室温时长期保持液态而温度达体温时可凝胶化，具有良好的组织相容性，有望成为药物尤其是生物大分子制剂的载体和细胞支架材料。壳聚糖 /β- 甘油磷酸钠温敏型水凝胶可以模仿天然细胞外基质促进细胞黏附、迁移和增殖[41-43]。此次实验进一步证明了壳聚糖 /β- 甘油磷酸钠温敏型水凝胶包封外泌体可以提高外泌体的组织滞留时间。

实验结果显示，间充质干细胞来源的外泌体能促进细胞增殖水平，恢复小鼠缺血组织的功能，而且部分是受外泌体中的 piR823 调控；壳聚糖 /β- 甘油磷酸钠温敏型水凝胶延长了外泌体在体内的滞留时间，明显增强了血流灌注及缺血后组织功能的恢复，治疗效果更显著。综上所述，作者发现壳聚糖水凝胶可以有效提高外泌体对缺血性疾病的治疗效果，为外泌体的临床转化提供了新策略。

作者贡献：实验设计为李杨欣、刘冯、张瑜，实验实施为刘冯、张瑜，实验评估为刘冯、张瑜、韩超珊，资料收集为王燕丽、骆威，成文为李杨欣、刘冯、张瑜，审核为李杨欣、刘冯、张瑜。

经费支持：该文章接受了“国家自然科学基金重大研究计划项目 (91849122)、国家自然科学基金面上项目 (81870194) 及江苏省‘六大人才高峰’创新团队项目 (BU 24600117)”的资助。所有作者声明，经费支持没有影响文章观点和对研究数据客观结果的统计分析及其报道。

利益冲突：文章的全部作者声明，在课题研究和文章撰写过程中不存在利益冲突。

机构伦理问题：实验过程遵循了国际兽医学编辑协会《关于动物伦理与福利的作者指南共识》和本地及国家法规。实验动物在麻醉下进行所有的手术，并尽一切努力最大限度地减少其疼痛、痛苦和死亡。

写作指南：该研究遵守国际医学期刊编辑委员会《学术研究实验与报告和医学期刊编辑与发表的推荐规范》。

文章查重：文章出版前已经过专业反剽窃文献检测系统进行 3 次查重。

文章外审：文章经小同行外审专家双盲外审，同行评议认为文章符合期刊发稿宗旨。

生物统计学声明：该文统计学方法已经苏州大学医学部心血管病研究所生物统计学专家审核。

4 参考文献 References

[1] CONTE SM, VALE PR. Peripheral Arterial Disease. Heart Lung Circ. 2018;27(4):427-432.

[2] IWASE T, NAGAYA N, FUJII T, et al. Comparison of angiogenic potency between mesenchymal stem cells and mononuclear cells in a rat model of hindlimb ischemia. Cardiovasc Res. 2005;66(3):543-551.

[3] OSTERBERG K, FALKENBERG M, RESCH T. Endovascular technique for arterial shunting to prevent intraoperative ischemia. Eur J Vasc Endovasc Surg. 2014;48(2):126-130.

[4] SANTISTEVAN JR. Acute Limb Ischemia: An Emergency Medicine Approach. Emerg Med Clin North Am. 2017;35(4):889-909.

[5] LI M, ZHOU H, JIN X, et al. Autologous bone marrow mononuclear cells transplant in patients with critical leg ischemia: preliminary clinical results. Exp Clin Transplant. 2013;11(5):435-439.

[6] EGOROVA NN, GUILLERME S, GELIJNS A, et al. An analysis of the outcomes of a decade of experience with lower extremity revascularization including limb salvage, lengths of stay, and safety. J Vasc Surg. 2010;51(4):878-885, 885 e871.

[7] KRAMANN R, GOETTSCH C, WONGBOONSIN J, et al. Adventitial MSC-like Cells Are Progenitors of Vascular Smooth Muscle Cells and Drive Vascular Calcification in Chronic Kidney Disease. Cell Stem Cell. 2016;19(5):628-642.

[8] MAZINI L, ROCHETTE L, ADMOU B, et al. Hopes and Limits of Adipose-Derived Stem Cells (ADSCs) and Mesenchymal Stem Cells (MSCs) in Wound Healing. Int J Mol Sci. 2020;21(4):1306.

[9] DING Y, JOHNSON R, SHARMA S, et al. Tethering transforming growth factor beta1 to soft hydrogels guides vascular smooth muscle commitment from human mesenchymal stem cells. Acta Biomater. 2020;105:68-77.

[10] HAN L, ZHOU Y, ZHANG R, et al. MicroRNA Let-7f-5p Promotes Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells Survival by Targeting Caspase-3 in Alzheimer Disease Model. Front Neurosci. 2018;12:333.

[11] BOON RA, DIMMELER S. MicroRNAs in myocardial infarction. Nat Rev Cardiol. 2015;12(3):135-142.

[12] POLLER W, DIMMELER S, HEYMANS S, et al. Non-coding RNAs in cardiovascular diseases: diagnostic and therapeutic perspectives. Eur Heart J. 2018;39(29):2704-2716.

[13] POOLE A. Collagen synthesis in rats with silica-induced pulmonary fibrosis. Arch Toxicol Suppl. 1987;11:285-287.

[14] FENG Y, HUANG W, WANI M, et al. Ischemic preconditioning potentiates the protective effect of stem cells through secretion of exosomes by targeting Mecp2 via miR-22. PLoS One. 2014;9(2):e88685.

[15] ZHANG HC, LIU XB, HUANG S, et al. Microvesicles derived from human umbilical cord mesenchymal stem cells stimulated by hypoxia promote angiogenesis both in vitro and in vivo. Stem Cells Dev. 2012;21(18):3289-3297.

[16] IMAI T, TAKAHASHI Y, NISHIKAWA M, et al. Macrophage-dependent clearance of systemically administered B16BL6-derived exosomes from the blood circulation in mice. J Extracell Vesicles. 2015;4:26238.
[17] FENG J, WU Y, CHEN W, et al. Sustained release of bioactive IGF-1 from a silk fibroin microsphere-based injectable alginate hydrogel for the treatment of myocardial infarction. J Mater Chem B. 2020;8(2):308-315.
[18] ZHANG K, ZHAO X, CHEN X, et al. Enhanced Therapeutic Effects of Mesenchymal Stem Cell-Derived Exosomes with an Injectable Hydrogel for Hindlimb Ischemia Treatment. ACS Appl Mater Interfaces. 2018;10(36):30081-30091.
[19] VENKEI ZG, CHOI CP, FENG S, et al. A kinesin Klp10A mediates cell cycle-dependent shuttling of Piwi between nucleus and nuage. PLoS Genet. 2020;16(3):e1008648.
[20] ZUO Y, ZOU Q, LIN J, et al. 2lpiRNApred: a two-layered integrated algorithm for identifying piRNAs and their functions based on LFE-GM feature selection. RNA Biol. 2020;17(6):892-902.
[21] ZHANG W, YAO G, WANG J, et al. ncRPheno: a comprehensive database platform for identification and validation of disease related noncoding RNAs. RNA Biol. 2020;17(7):943-955.
[22] PARHAD SS, YU T, ZHANG G, et al. Adaptive Evolution Targets a piRNA Precursor Transcription Network. Cell Rep. 2020;30(8):2672-2685 e5.
[23] YAN H, WU QL, SUN CY, et al. piRNA-823 contributes to tumorigenesis by regulating de novo DNA methylation and angiogenesis in multiple myeloma. Leukemia. 2015;29(1):196-206.
[24] YANG J, XUE FT, LI YY, et al. Exosomal piRNA sequencing reveals differences between heart failure and healthy patients. Eur Rev Med Pharmacol Sci. 2018;22(22):7952-7961.
[25] WEICK EM, MISKA EA. piRNAs: from biogenesis to function. Development. 2014;141(18):3458-3471.
[26] SARKAR A, VOLFF JN, VAURY C. piRNAs and their diverse roles: a transposable element-driven tactic for gene regulation? FASEB J. 2017;31(2):436-446.
[27] ILIEV R, FEDORKO M, MACHACKOVA T, et al. Expression Levels of PIWI-interacting RNA, piR-823, Are Deregulated in Tumor Tissue, Blood Serum and Urine of Patients with Renal Cell Carcinoma. Anticancer Res. 2016;36(12):6419-6423.
[28] TANG X, XIE X, WANG X, et al. The Combination of piR-823 and Eukaryotic Initiation Factor 3 B (EIF3B) Activates Hepatic Stellate Cells via Upregulating TGF-beta1 in Liver Fibrogenesis. Med Sci Monit. 2018;24:9151-9165.
[29] YIN J, JIANG XY, QI W, et al. piR-823 contributes to colorectal tumorigenesis by enhancing the transcriptional activity of HSF1. Cancer Sci. 2017;108(9):1746-1756.
[30] CHENG J, DENG H, XIAO B, et al. piR-823, a novel non-coding small RNA, demonstrates in vitro and in vivo tumor suppressive activity in human gastric cancer cells. Cancer Lett. 2012;315(1):12-17.
[31] DESROCHERS LM, ANTONYAK MA, CERIONE RA. Extracellular Vesicles: Satellites of Information Transfer in Cancer and Stem Cell Biology. Dev Cell. 2016;37(4):301-309.
[32] BEI Y, DAS S, RODOSTHENOUS RS, et al. Extracellular Vesicles in Cardiovascular Theranostics. Theranostics. 2017;7(17):4168-4182.
[33] GANGADARAN P, RAJENDRAN RL, LEE HW, et al. Extracellular vesicles from mesenchymal stem cells activates VEGF receptors and accelerates recovery of hindlimb ischemia. J Control Release. 2017;264:112-126.
[34] YAO X, LIU Y, GAO J, et al. Nitric oxide releasing hydrogel enhances the therapeutic efficacy of mesenchymal stem cells for myocardial infarction. Biomaterials. 2015;60:130-140.
[35] DU W, ZHANG K, ZHANG S, et al. Enhanced proangiogenic potential of mesenchymal stem cell-derived exosomes stimulated by a nitric oxide releasing polymer. Biomaterials. 2017;133:70-81.
[36] ANDERSON JD, JOHANSSON HJ, GRAHAM CS, et al. Comprehensive Proteomic Analysis of Mesenchymal Stem Cell Exosomes Reveals Modulation of Angiogenesis via Nuclear Factor-KappaB Signaling. Stem Cells. 2016;34(3):601-613.
[37] GALLINA C, TURINETTO V, GIACHINO C. A New Paradigm in Cardiac Regeneration: The Mesenchymal Stem Cell Secretome. Stem Cells Int. 2015;2015:765846.
[38] CACCIOTTI I, CECI C, BIANCO A, et al. Neuro-differentiated Ntera2 cancer stem cells encapsulated in alginate beads: First evidence of biological functionality. Mater Sci Eng C Mater Biol Appl. 2017;81:32-38.
[39] SHI Z, GAO X, ULLAH MW, et al. Electroconductive natural polymer-based hydrogels. Biomaterials. 2016;111:40-54.
[40] XU C, ZHANG Y, XU K, et al. Multifunctional cationic nanosystems for nucleic acid therapy of thoracic aortic dissection. Nat Commun. 2019;10(1):3184.
[41] ZHENG Y, WANG W, ZHAO J, et al. Preparation of injectable temperature-sensitive chitosan-based hydrogel for combined hyperthermia and chemotherapy of colon cancer. Carbohydr Polym. 2019;222:115039.
[42] ZHANG W, JIN X, LI H, et al. Injectable and body temperature sensitive hydrogels based on chitosan and hyaluronic acid for pH sensitive drug release. Carbohydr Polym. 2018;186:82-90.
[43] SONG K, LI L, YAN X, et al. Characterization of human adipose tissue-derived stem cells in vitro culture and in vivo differentiation in a temperature-sensitive chitosan/beta- glycerophosphate/collagen hybrid hydrogel. Mater Sci Eng C Mater Biol Appl. 2017;70(Pt 1):231-240.

(责任编辑：GW，ZN，TXY)