

# 携带 miRNA 的间充质干细胞源外泌体在组织修复、治疗相关疾病中的应用与优势

<https://doi.org/10.12307/2021.148>

施沁, 孙宝兰, 杨晓清, 张玉泉

投稿日期: 2020-07-22

送审日期: 2020-07-24

采用日期: 2020-08-19

在线日期: 2020-12-21

中图分类号:

R459.9; R394.2; R318

文章编号:

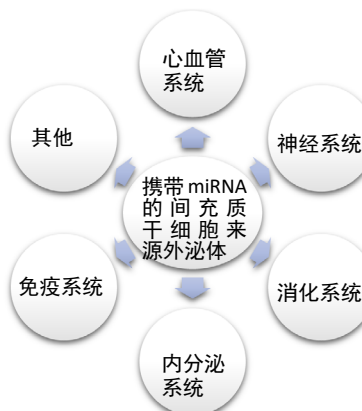
2095-4344(2021)31-05040-06

文献标识码: A

## 文章快速阅读:

### 文章特点一

△近年来间充质干细胞来源外泌体所携带的miRNA较多见于心血管系统、消化系统、神经系统、内分泌系统及免疫系统疾病的临床前研究。



(1) 在各个系统领域中, 间充质干细胞来源外泌体被证明可通过其携带的miRNA发挥促进细胞增殖、促进血管生成等生物学作用;  
(2) 通过基因工程等技术对携带miRNA的间充质干细胞来源外泌体进行基因编辑, 能够使其成为组织工程领域颇具前景的一种非细胞制剂。

## 文题释义:

**微小RNA芯片(micro RNA microarray):** 又称micro RNA微阵列, 是一块带有micro RNA微阵列涂层的特殊玻璃片, 在数平方厘米的面积上安装数千或数万个核酸探针, 可以在同一时间定量分析成千上万个micro RNA表达水平, 是基因组学和分子生物学研究的有力工具。

**鞘磷脂酶抑制剂:** 又称GW4869, 德国哥根廷大学的Mikael Simons教授于2008年首次提出其可以抑制细胞分泌外泌体, 随后被广泛运用于外泌体领域研究。

## 摘要

**背景:** 近年来, 已有充分证据表明间充质干细胞来源外泌体对组织器官损伤具有修复作用, 能够用于多种疾病的治疗。miRNA是间充质干细胞来源外泌体中研究较多的一种成分。通过基因工程等技术对携带miRNA的间充质干细胞来源外泌体进行基因编辑, 能够使其成为组织工程领域颇具前景的一种非细胞制剂。

**目的:** 综述携带miRNA的间充质干细胞来源外泌体在组织工程领域的研究进展。

**方法:** 由第一作者检索PubMed、Web of Science数据库和中国知网数据库, 英文检索词为“mesenchymal stem cell, exosome, miRNA”, 中文检索词为“间充质干细胞, 外泌体, 微小RNA”。文献检索的时间范围为2000年1月至2020年5月, 语言种类为英文和中文, 文献类型包括论著和综述, 筛选出38篇文献进行分析。

**结果与结论:** 在各个系统领域中, 间充质干细胞来源外泌体被证明可通过其携带的miRNA发挥促进细胞增殖、抑制细胞凋亡、促进血管生成等生物学作用。目前, 国内外对间充质干细胞来源外泌体及其携带的miRNA在心血管系统、消化系统、神经系统、内分泌系统及免疫系统疾病的治疗作用已开展了较多的临床前实验研究, 揭示了许多新型miRNA在间充质干细胞修复组织损伤、预防及治疗相关疾病中的调控作用。

**关键词:** 间充质干细胞; 外泌体; 微小RNA; 损伤修复; 组织工程; 综述

**缩略语:** 间充质干细胞来源外泌体: mesenchymal stem cell-derived exosomes, MSC-Exo

## Mesenchymal stem cell-derived exosomes carrying miRNAs in tissue repair and treatment of related diseases: application and advantages

Shi Qin, Sun Baolan, Yang Xiaoqing, Zhang Yuquan

Affiliated Hospital of Nantong University, Nantong 226001, Jiangsu Province, China

Shi Qin, Doctoral candidate, Affiliated Hospital of Nantong University, Nantong 226001, Jiangsu Province, China

**Corresponding author:** Zhang Yuquan, MD, Chief physician, Professor, Affiliated Hospital of Nantong University, Nantong 226001, Jiangsu Province, China

## Abstract

**BACKGROUND:** In recent years, increasing evidences indicate that exosomes secreted by mesenchymal stem cells (MSC-Exo) exert a repair effect on tissue and organ damage and can be used for the treatment of various diseases. MicroRNA (miRNA) is one of the most studied components in MSC-Exo. Gene editing of MSC-Exo carrying miRNA through genetic engineering and other technologies can make it a promising acellular preparation in the field of tissue engineering.

**OBJECTIVE:** To review the research progress of MSC-Exo carrying miRNA in the field of tissue engineering.

**METHODS:** The PubMed, Web of Science and CNKI databases were used to search by the first author for original and review articles published from January

南通大学附属医院, 江苏省南通市 226001

第一作者: 施沁, 女, 1993年生, 江苏省南通市人, 汉族, 南通大学医学院在读博士, 主要从事间充质干细胞及妇产科基础研究。

通讯作者: 张玉泉, 博士, 主任医师, 教授, 南通大学附属医院, 江苏省南通市 226001

<https://orcid.org/0000-0002-5238-8161> (施沁)

基金资助: 国家自然科学基金面上项目(81771527), 项目负责人: 张玉泉; 江苏省研究生科研与实践创新计划-科研计划项目(KYCX19\_2075), 项目负责人: 施沁

引用本文: 施沁, 孙宝兰, 杨晓清, 张玉泉. 携带miRNA的间充质干细胞源外泌体在组织修复、治疗相关疾病中的应用与优势[J]. 中国组织工程研究, 2021, 25(31):5040-5045.



2000 to May 2020 using the key words of “mesenchymal stem cells; exosome; micro RNA” in English and Chinese respectively. Totally 38 articles were included in analysis.

**RESULTS AND CONCLUSION:** In various systems, MSC-Exo has been shown to promote cell proliferation, inhibit apoptosis and promote angiogenesis through their miRNAs. Many preclinical studies have been carried out on the therapeutic effects of MSC-Exo and its miRNAs in cardiovascular system, digestive system, nervous system, endocrine system and immune system diseases, revealing that miRNAs exist in MSC-Exo, and their regulating role in repairing tissue damage, preventing and treating related diseases.

**Key words:** mesenchymal stem cells; exosome; microRNA; repair; tissue engineering; review

**Funding:** the General Program of National Natural Science Foundation of China, No. 81771527 (to ZYQ); the Research Project and Innovation Program of Jiangsu Province, No. KYCX19\_2075 (to SQ)

**How to cite this article:** SHI Q, SUN BL, YANG XQ, ZHANG YQ. Mesenchymal stem cell-derived exosomes carrying miRNAs in tissue repair and treatment of related diseases: application and advantages. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu*. 2021;25(31):5040-5045.

## 0 引言 Introduction

间充质干细胞属于成体干细胞的一种，主要存在于骨髓、脂肪、脐血、脐带华通氏胶中，能够分泌多种生物活性分子。研究表明，相比于间充质干细胞自身，许多间充质干细胞来源的分泌物及其衍生的生物制剂对于组织修复、器官再生更为有效<sup>[1]</sup>。与直接移植干细胞相比，间充质干细胞来源细胞外囊泡作为组织修复的非细胞制剂具有显著优势：制备更容易、冷冻干燥、包装和运输，还能够避免细胞疗法带来的免疫排斥、肿瘤形成、伦理争议等问题，是组织工程领域极具应用前景的治疗材料<sup>[2]</sup>。外泌体 (exosome, Exo) 是直径在 30–200 nm 之间的一种细胞外囊泡，主要是细胞内容物微体微粒内陷后形成多囊泡体与细胞膜融合并释放到胞外基质中形成。外泌体能够将蛋白质、脂质、mRNA、miRNA 等各种分子从亲代细胞转运到其他细胞，是细胞间重要的信号传导介质<sup>[3]</sup>。

微小 RNA (micro RNA, miRNA) 是一种小型非编码 RNA，其长度介于 19–23 nt 之间。研究表明，miRNA 能够通过与靶 mRNA 的 3'UTR 端结合，介导转录后调控和 RNA 沉默。miRNA 的上述功能使其成为机体多个组织器官发育过程的关键调节因子，例如干细胞的自我更新、肌细胞生成、胚胎发育、细胞分化和大脑发育等；miRNA 也与许多癌症和病毒感染密切相关<sup>[4]</sup>。2007 年，美国学者 GRECO 等<sup>[5]</sup>使用 miRNA 芯片分析了未分化的人间充质干细胞和间充质干细胞衍生的神经元细胞的 miRNA 表达谱，由此开创了间充质干细胞领域 miRNA 研究的先河。

近年来，间充质干细胞来源外泌体 (mesenchymal stem cell-derived exosomes, MSC-Exo) 已在多种疾病中显示出其潜在的临床应用价值。已有充分证据表明，MSC-Exo 对组织器官损伤具有修复作用，有望用于多种疾病的临床治疗<sup>[6]</sup>。随着人们对 MSC-Exo 作用机制的深入探索，越来越多的研究证明 MSC-Exo 可通过其携带的 miRNA 发挥促进细胞增殖、抑制细胞凋亡、促进血管生成等作用。利用基因工程技术对携带 miRNA 的 MSC-Exo 进行基因编辑，能够使其成为组织工程领域颇具前景的一种非细胞生物制剂<sup>[7]</sup>。目前，围绕 MSC-Exo miRNA 的相关基础及临床前研究成果日渐增多，采用携带特定 miRNA 的 MSC-Exo 进行组织修复、肿瘤防治等已经成为干细胞及组织工程领域研究的新趋势。

该文章旨在综述目前国内外有关 MSC-Exo miRNA 促进各种组织器官损伤修复、促进血管生成、抑制细胞凋亡等方面的最新研究进展，及其对各种疾病的治疗作用及相关机制，探讨 MSC-Exo miRNA 在组织工程领域的应用前景及发展趋

势，并发掘未来有待研究的新领域，为广大干细胞研究者们提供新思路。

## 1 资料和方法 Data and methods

**1.1 资料来源** 由第一作者在 2020 年 5 月检索 PubMed、Web of Science 数据库和中国知网数据库，英文检索词为 “mesenchymal stem cell, exosome, miRNA”，中文检索词为 “间充质干细胞, 外泌体, 微小 RNA”。文献检索的时间范围为 2000 年 1 月至 2020 年 5 月，语言种类为英文和中文，文献类型包括研究型论著、综述、学位论文。初步检索得到 83 篇文献。

### 1.2 资料筛选及评价

**纳入标准:** ①关于 MSC-Exo 通过 miRNA 修复各种细胞、组织、器官及在治疗各大系统疾病中的作用及机制研究；② MSC-Exo 通过 miRNA 延缓各大系统疾病进展、改善疾病结局的作用及机制研究。

**排除标准:** ①内容为间充质干细胞外泌体的相关研究，但并未涉及 miRNA 的文献；②内容为肿瘤及肿瘤微环境中自身间充质干细胞外泌体的作用研究，不涉及组织工程领域或疾病治疗的文献；③重复文献。

**1.3 资料提取与文献质量评价** 计算机检索得到 83 篇文献，阅读标题和摘要进行初筛，排除中英文文献重复报道和与纳入标准无关的文献。查阅全文，判断与纳入标准一致的文章，最后保留 38 篇文献做进一步分析。

## 2 结果 Results

**2.1 MSC-Exo 传递 miRNA 的特性及生物学功能** 外泌体几乎存在于所有生物体液中，包括血液、尿液、唾液、脑脊液和细胞预处理的培养基。它们最初是通过多囊泡体与质膜融合而形成的，或者直接从质膜中释放出来。目前已有较多研究证明了不同来源的外泌体通过传递 mRNA、miRNA 和其他成分来实现细胞间通讯，并调节受体细胞的功能<sup>[8]</sup>。外泌体的成分及含量因细胞类型、病理条件以及亲代间充质干细胞的预处理或遗传操作而异。外泌体的这种生物学特性为其成为组织工程领域的新型非细胞制剂提供了可能。研究者们采用各种方式预处理亲代间充质干细胞，人为干预其外泌体中 miRNA 等成分的表达量，使其发挥特定的生物学功能。2010 年，CHEN 等<sup>[9]</sup>首次证明了 MSC-Exo 能够充当 miRNA 传递的媒介，介导细胞间通讯。他们观察到人胚胎干细胞衍生的间充质干细胞条件培养基中富含 miRNA，并通过微阵列分析和定量反转录-聚合酶链反应检测发现其中存在较多的 miRNA

为 hsa-let-7b、hsa-let-7g; 随后, 他们采用细胞学实验证明上述富含 miRNA 的 MSC-Exo 能够被心肌细胞有效吸收。MSC-Exo 传递 miRNA 的特性由此被发掘。在此之后, MSC-Exo 携带 miRNA 的生物学特性在各个组织系统中得到了运用。下文将根据 MSC-Exo miRNA 在不同系统领域中的应用现状分别加以综述。

## 2.2 携带 miRNA 的 MSC-Exo 在组织工程领域的应用

### 2.2.1 携带 miRNA 的 MSC-Exo 在心血管系统中的应用

有关 MSC-Exo 的研究最早始于心血管系统领域。在 2006 年, 美国学者 GNECCHI 等<sup>[10]</sup> 发现过表达 Akt 的间充质干细胞条件培养基显著降低了心肌梗死的面积, 并改善了心室功能, 他们首次提出过表达 Akt 的间充质干细胞可能通过旁分泌作用在心肌梗死的急性期发挥治疗作用。随后, 在 2010 年, LAI 等<sup>[11]</sup> 进一步证明间充质干细胞通过分泌外泌体来介导其心脏保护性旁分泌作用。研究发现, MSC-Exo 可以通过促进血管生成来减少心肌组织的缺血性损伤, 从而缩小心肌梗死面积, 维持心脏收缩和舒张功能, 这也是心血管领域首次明确应用 MSC-Exo 进行治疗的报道。

2015 年, 国内学者 YANG 等<sup>[12]</sup> 研究发现, 纯化后的 MSC-Exo 能够激活内皮细胞中的血管内皮生长因子表达, 从而发挥促进血管生成的作用; 在体外培养的间充质干细胞培养基中加入一定浓度的中药“补阳还五汤”成分后, MSC-Exo 中与血管生成相关的 miRNA 表达量发生改变 (miR-126 增多, miR-221、miR-222 减少), 进而促进血管内皮生长因子的表达; 随后, 他们利用双侧颈动脉结扎法建立大鼠脑缺血模型, 发现给予“补阳还五汤”刺激后的 MSC-Exo 能促进大鼠脑组织中血管内皮生长因子和 Ki-67 的表达, 并使脑血管密度增加。该研究初步揭示了携带 miRNA 的 MSC-Exo 对血管生成的促进作用, 并证明了其在脑部缺血性损伤疾病中的应用价值。

2016 年, ZHANG 等<sup>[13]</sup> 从体外培养的 SD 大鼠骨髓间充质干细胞中分离并鉴定了 MSC-Exo, 细胞学实验观察到 Dil 荧光染料标记的 MSC-Exo 能够被心脏干细胞摄取, 并刺激心脏干细胞的增殖、迁移和血管形成, 其作用效果呈现一定的剂量依赖性。在大鼠心肌梗死模型中, MSC-Exo 预处理的心脏干细胞移植能够增加大鼠心脏毛细血管密度, 抑制心肌纤维化, 有助于远期心功能的恢复。随后, 他们采用 miRNA 芯片 (Affymetrix GeneChip miRNA 4.0 arrays) 分析了 MSC-Exo 作用前后心脏干细胞中的 miRNA 表达, 结合 GO 富集分析、基因组通路分析, 推测 MSC-Exo 可能通过向心脏干细胞传递 miR-760-3p, 靶向调控 Wnt1、Wnt9a、Egf、PDGf 等与细胞分化和血管生成相关的基因。上述实验不仅充分证明了 MSC-Exo 在细胞间的传递性, 还提示了 miRNA 作为 MSC-Exo 中携带的重要成分, 对于其介导的受体细胞的生物学功能可能起着关键性作用。

鞘磷脂酶抑制剂——GW4869 是目前公认的外泌体抑制剂, 它的使用为外泌体的功能研究提供了很大的便利。2017 年, GONG 等<sup>[14]</sup> 在体外诱导人脐静脉内皮细胞成管实验中, 观察到富含促血管生成 miRNA (pro-angiomiRs) 的 MSC-Exo 向人脐静脉内皮细胞转移, 在培养基中加入外泌体分泌阻滞剂 GW4869 (10 μmol/L) 后, pro-angiomiRs 的表达量明显降低, 这一实验证明了这些促血管生成相关的 miRNA 主要存在于

MSC-Exo 中, 并能够转运至内皮细胞, 发挥促进血管生成作用。将负载人脐静脉内皮细胞的基质胶塞移植到小鼠皮下, 然后注射 MSC-Exo, 基质胶塞内的血流量明显增加, 荧光示踪发现注射进基质胶塞中的 MSC-Exo 迅速被人脐静脉内皮细胞摄取。该研究直观地证明了 MSC-Exo miRNA 的传递性, 进一步加深了人们对于 MSC-Exo miRNA 促进血管生成作用机制的认识。

除上述研究外, 近两年国内也出现了几项有关 MSC-Exo miRNA 在心血管领域研究的报道。2019 年, 国内学者詹小舒等<sup>[15]</sup> 分离并鉴定了犬脐带来源 MSC-Exo, 体外实验证明犬脐带 MSC-Exo 能够一定程度促进血管内皮细胞的增殖、迁移, 抑制内皮细胞凋亡, 高通量测序检测犬脐带 MSC-Exo 中高表达的 miRNA 主要有 miR-199、miR-21、let-7a、let-7b、miR-23a。李朝富等<sup>[16]</sup> 利用 Dil 染料标记缺氧预处理的骨髓 MSC-Exo, 免疫荧光分析骨髓 MSC-Exo 能够被大鼠心肌微血管内皮细胞摄取, 并且可能通过传递 miR-214 促进内皮细胞的增殖。除了促进血管生成及内皮细胞增殖的作用外, 贺继刚等<sup>[17]</sup> 发现过表达心肌细胞转录因子 GATA-4 的小鼠骨髓 MSC-Exo 通过 miR-330-3p 抑制 Ap2m1 蛋白的表达, 从而降低心肌细胞的凋亡率。

就上述研究报道而言, 一部分研究仅分析了 MSC-Exo 中相关 miRNA 的表达, 并根据靶基因的预测及下游蛋白的表达水平对其在 MSC-Exo 作用过程中发挥的功能做了初步推断, 相关的基因功能及治疗效果还需要更加深入的探索。

### 2.2.2 携带 miRNA 的 MSC-Exo 在神经系统中的应用

在神经系统领域, 有关 MSC-Exo miRNA 的研究最早与肿瘤相关。2013 年, 美国学者 KATAKOWSKI 等<sup>[18]</sup> 发现表达 miR-146b 的 MSC-Exo 能够抑制神经胶质瘤的生长。他们首先设计质粒转染实验证明间充质干细胞能够内源性地将 miR-146b 包装到外泌体中, 在体外培养的 9L 细胞培养基中加入过表达 miR-146b 的 MSC-Exo 作用 4 h, 定量 PCR 检测实验组 9L 细胞中的 miR-146b 表达比对照组高 (10.5±1.4) 倍, 这表明间充质干细胞能够通过外泌体在体外运输 miRNA 并将 miRNA 传递到肿瘤细胞中, 过表达 miR-146b 的 MSC-Exo 干预后的 9L 细胞中 EGFR 和 NF-κB 蛋白水平显著降低。将上述外泌体处理后的肿瘤细胞植入大鼠皮下进行移植瘤生长实验, 结果显示过表达 miR-146b MSC-Exo 处理组的移植瘤在体内生长速度明显降低, 说明通过 MSC-Exo 递送的 miR-146b 在受体肿瘤细胞中具有特定的功能活性。最后, 为了确定过表达 miR-146b 的 MSC-Exo 是否在体内具有抗肿瘤作用, 他们对移植有 9L 胶质肉瘤的 Fischer 大鼠颅内注射外泌体, 结果显示, 与对照相比, 注射过表达 miR-146b MSC-Exo 的大鼠颅内肿瘤体积显著降低。这些数据证明了表达 miR-146b 的 MSC-Exo 在大鼠脑中能够发挥抗肿瘤作用, 有望为恶性神经胶质瘤的靶向治疗提供新的策略。

除了神经系统肿瘤以外, 最新的研究表明 MSC-Exo 通过传递 miRNA 对神经元及神经细胞发挥修复作用。2017 年, ZHANG 等<sup>[19]</sup> 研究发现用 MSC-Exo 治疗脑损伤可以促进大脑皮质神经元的轴突生长, 究其机制, MSC-Exo 能够选择性地 miR-17-92 转运到受体神经元中, 并激活 PTEN/mTOR 信号传导途径, 从而促进轴突的生长。在同一年, 国外学者研究

报道了骨髓 MSC-Exo 通过 miRNA 依赖性机制促进视网膜神经节细胞的存活<sup>[20]</sup>。

上述研究报道揭示了 MSC-Exo 通过向神经系统特定细胞递送 miRNA, 发挥抗肿瘤或修复损伤神经元的作用。携带 miRNA 的 MSC-Exo 作为一种靶向治疗载体, 为将来神经系统肿瘤及脑损伤的干细胞临床治疗创造了新的途径。但目前该领域涉及 miRNA 调控作用机制的研究还较少, 更多有治疗价值的 miRNA 有待被挖掘。

**2.2.3 携带 miRNA 的 MSC-Exo 在消化系统中的应用** 在消化系统中, MSC-Exo 研究主要集中于针对肝脏肿瘤及各种原因引发的肝脏病变的治疗。2015 年, 有研究报道 miR-122 修饰的脂肪 MSC-Exo 能够增加肝细胞癌的化疗敏感性<sup>[21]</sup>。该研究采用表达 miR-122 的质粒转染脂肪间充质干细胞, 转染后 48 h 收集脂肪间充质干细胞衍生的外泌体 (miR-122-Exo) 并添加到受体肝细胞癌细胞中, 结果显示, miR-122 转染的脂肪间充质干细胞可以有效地将 miR-122 包装到其分泌的外泌体中, 从而介导脂肪间充质干细胞与肝细胞癌细胞之间的 miR-122 通讯, 并通过改变 miR-122 靶基因的表达提高肝细胞癌细胞对化学治疗药物的敏感性。此外, 裸鼠实验表明肿瘤内直接注射 miR-122-Exo 显著增加了索拉非尼在体内对肝细胞癌的抗肿瘤功效, 这一研究提示改进脂肪间充质干细胞培养和外泌体纯化方法将增加脂肪间充质干细胞来源外泌体在临床应用中的可行性和安全性。

2020 年, 国内学者 LOU 等<sup>[22]</sup> 同样研究了脂肪间充质干细胞来源外泌体在改善肝细胞癌化疗敏感性方面的作用。与上一研究不同的是, LOU 等<sup>[22]</sup> 研究的目标 miRNA 为 miR-199a。MiR-199a-3p 是人类正常肝脏中第 3 高表达的 miRNA, 其减少与肝细胞癌患者的不良预后相关<sup>[23]</sup>。将 miR-199a-3p 递送至肝细胞癌细胞可能是增加肝细胞癌化疗敏感性的潜在策略。由于向体内直接输注 miRNA 容易发生降解, 需要有效的媒介物来介导转运。LOU 等<sup>[22]</sup> 通过 miR-199a 慢病毒感染和嘌呤霉素筛选, 构建经 miR-199a 修饰的脂肪间充质干细胞 (AMSC-199a), 从 AMSC-199a 的上清液中分离出 miR-199 修饰的外泌体 (AMSC-Exo-199a), 并通过透射电子显微镜、纳米颗粒跟踪分析和流式细胞仪进行鉴定, 通过实时 PCR 定量检测肝细胞癌组织、脂肪间充质干细胞、外泌体和肝细胞癌细胞中 miR-199a 的表达水平, 结果表明, AMSC-Exo-199a 具有外泌体的经典特征, 可以有效介导 miR-199a 传递至肝细胞癌细胞。另外, AMSC-Exo-199a 通过靶向 mTOR 并随后抑制 mTOR 途径, 使肝细胞癌细胞对阿霉素显著敏感。动物实验发现, 静脉内注射的 AMSC-Exo-199a 可以分布到肿瘤组织周围, 并显著提高化疗药物阿霉素在体内对肝癌细胞生长的抑制作用, 这一研究充分证明了 AMSC-Exo-199a 可以作为 miR-199a 递送的有效载体, 并且它们通过靶向 mTOR 途径有效地使肝细胞癌对化疗药物更加敏感。AMSC-Exo-199a 给药可能为改善肝细胞癌化疗敏感性提供新的策略。除肝细胞癌外, 携带 miRNA 的 MSC-Exo 还被运用于治疗肝纤维化、坏死性小肠结肠炎等。2017 年, LOU 等<sup>[24]</sup> 曾发表文章阐述 miR-122 能够通过负调节肝星状细胞的增殖和反式激活在肝纤维化过程中起重要作用, 证明了

AMSC-Exo 介导的 miR-122 通讯能抑制肝星状细胞的活化并减轻胶原蛋白的沉积, 从而增强脂肪间充质干细胞对肝纤维化的治疗效果。

非酒精性脂肪肝疾病是最常见的肝脏病变之一。2019 年, 国外学者 BARANOVA 等<sup>[25]</sup> 发表综述介绍了 AMSC-Exo 可通过释放抑制肿瘤、抗纤维化的 miR-122, 从而主动延迟非酒精性脂肪肝疾病的进程。从病理过程上看, 在非酒精性脂肪肝疾病的早期阶段, 肝内产生的 miR-122 有所下降, 而脂肪产生的含 miRNA 的外泌体分泌增加, 血流将外泌体带到肝脏, 在那里释放其 miRNA 以调节其肝内靶基因。当脂肪变质蔓延至衰竭的肝实质时, 肝脏的保护性 miRNA 供应逐渐减少, 从而导致肝脏的纤维化失代偿, 增加了肝癌的发生风险。有研究显示, 输注 miR-122 等 miRNA 可能对预防非酒精性脂肪肝疾病相关的肝细胞癌有效<sup>[26]</sup>。由此可见, 目前在消化系统尤其是肝脏疾病领域, 携带 miRNA 的 MSC-Exo 研究已初见成效, 其中对于 miR-122 的研究最为深入。

除肝脏损伤以外, 携带 miRNA 的 MSC-Exo 在消化系统其他脏器病变的应用鲜有报道。2018 年, MCCULLOH 等<sup>[27]</sup> 曾研究了几种不同组织来源干细胞衍生的外泌体对早产大鼠幼崽坏死性小肠结肠炎发生率的影响。实验采用腹腔内注射的方式给坏死性小肠结肠炎模型大鼠幼崽分别注射 4 种不同来源干细胞 (羊水来源间充质干细胞、骨髓来源间充质干细胞、羊水源性神经干细胞及新生儿肠道神经干细胞) 衍生的外泌体, 结果显示: 与仅接受 PBS 的幼崽相比, 用外泌体处理过的坏死性小肠结肠炎幼崽的肠道损伤症状要轻得多; 数据统计分析结果表明, 干细胞外泌体注射组幼崽肠道损伤的发生率均低于注射 PBS 的对照组, 以  $4.0 \times 10^8$  (50  $\mu$ L) 注射量的羊水源性神经干细胞外泌体组的发生率最低。该研究初步证明了干细胞外泌体疗法对坏死性小肠结肠炎的预防性作用, 对外泌体中所含成分及相关作用机制还有待进一步探索。

**2.2.4 携带 miRNA 的 MSC-Exo 在内分泌系统中的应用** 近年来, MSC-Exo 开始被尝试运用于改善糖尿病周围神经病变。糖尿病周围神经病变是最常见的糖尿病慢性并发症之一, 有关 2 型糖尿病的临床研究表明, 控制血糖对改善糖尿病周围神经病变几乎没有作用<sup>[28]</sup>。神经血管内皮功能障碍是导致糖尿病周围神经病变的主要原因, 间充质干细胞能够通过旁分泌作用及其分泌的血管生成因子和神经营养因子以及抗炎分子来促进周围神经病变的修复。2019 年 11 月, FAN 等<sup>[29]</sup> 在线发表了关于 MSC-Exo 改善糖尿病周围神经病变的研究成果, 他们首次证明用 MSC-Exo 治疗糖尿病小鼠可减轻神经血管功能障碍和轴突脱髓鞘, 从而改善神经功能, 在上述过程中, MSC-Exo miRNA 可能扮演着重要角色。经检测发现, 来自小鼠骨髓间充质干细胞的外泌体中富含 miRNA, 包括 let-7a, miR-23a 和 miR-125b 等, 它们协同作用于 TLR4 / NF- $\kappa$ B 信号通路, 将糖尿病小鼠坐骨神经中的炎症巨噬细胞转化为 M2 表型, 从而显著降低了促炎细胞因子水平并抑制了炎症反应。他们的研究进一步显示了利用含有 miRNA 及蛋白质等成分的工程化外泌体治疗各种疾病的新前景。

另一方面, 国内学者 JI 等<sup>[30]</sup> 发现携带 miRNA 的 MSC-Exo 对肥胖导致的创伤性脊髓损伤具有潜在的治疗作用。在肥

胖大鼠创伤性脊髓损伤模型中，骨髓 MSC-Exo 中的 miR-21 有所降低。他们采用 BMS 评分评估脊髓损伤模型大鼠的运动能力，通过体外实验观察 MSC-Exo 对损伤脊髓组织中细胞的保护作用，结果发现来自肥胖大鼠的骨髓 MSC-Exo 对脊髓损伤并没有保护作用，过表达 miR-21 的 MSC-Exo 能降低脊髓组织中细胞的凋亡率，从而减轻脊髓损伤的程度；肥胖大鼠骨髓 MSC-Exo 中 miR-21 的减少与其胰岛素抵抗有关。

由此可见，在内分泌系统领域中，研究者通过建立糖尿病等动物模型，已在大鼠及小鼠体内观察到 MSC-Exo 传递 miRNA 改善组织细胞损伤、抑制炎症反应等作用，并能在一定程度上改善疾病的预后，为糖尿病、肥胖症伴随的难治性并发症治疗创造了新的可能。目前尚未出现有关 MSC-Exo 在骨质疏松、痛风、脂质代谢紊乱等其他内分泌性疾病中的应用研究，未来有待进一步探索。

**2.2.5 携带 miRNA 的 MSC-Exo 在免疫系统中的应用** 携带 miRNA 的 MSC-Exo 参与了慢性炎症的发生及发展过程。2015 年，意大利学者评估了脂多糖预处理的 MSC-Exo(以下简称 LPS MSC-Exo)对慢性炎症及伤口愈合的治疗效果及机制<sup>[31]</sup>。研究发现，LPS MSC-Exo 能够在体外增加巨噬细胞抗炎细胞因子的表达，并促进 M2 巨噬细胞的活化，从而比未经脂多糖处理的 MSC-Exo 具有更好的调节巨噬细胞平衡的能力。微阵列分析结果显示，miRNA let-7b 在 LPS MSC-Exo 中表达显著增多。此外，在体内实验中，该研究同样证明了 LPS MSC-Exo 能够显著减轻糖尿病大鼠皮肤伤口的炎症反应，加快伤口的愈合，进一步的机制研究发现，LPS MSC-Exo 传递的 miRNA let-7b 可能通过 TLR4/NF-κB/STAT3/AKT 信号通路对巨噬细胞的可塑性发挥调节作用。2019 年，有学者提出携带 miRNA 的 MSC-Exo 作为一种非细胞制剂在运用于炎症治疗时不能忽略其 miRNA 的稳定性问题<sup>[32]</sup>。由于细胞培养、外泌体分离提取等过程存在诸多不可控的干扰因素，即使是

来源于不同批次的同一种 MSC-Exo，其携带的 miRNA 都可能发生改变。例如，在脂肪 MSC-Exo 携带的 miRNA(let-7a-5p、miR-16-5p、miR-23a-3p、miR-26a-5p、miR-101-3p、miR-103a-3p、miR-221-3p、miR-423-5p、miR-425-5p) 中 miR-26a-5p/16-5p 的含量最为稳定，而 miR-103a-3p/425-5p 的表现则差强人意。虽然上述 miRNA 在 MSC-Exo 促进骨关节炎模型伤口愈合过程中都存在一定的作用，但鉴于含量的不稳定性，它们的临床应用价值显然会受到影响。这一研究也给其他领域 MSC-Exo 治疗研究的学者们以启示：当下迫切需要统一、标准化的 MSC-Exo 提取及鉴定标准来提高外泌体成分的稳定性，这对于 MSC-Exo 成为一种非细胞制剂走上临床是至关重要的。法国学者 COSENZA 等<sup>[33]</sup> 曾就目前 MSC-Exo 在风湿性疾病治疗中的应用研究现状发表综述，并同样提出了统一 MSC-Exo 提取及鉴定标准的必要性。

另有证据表明，外泌体等胞外囊泡在风湿性疾病的发生发展中发挥相当重要的作用，但目前对于 MSC-Exo 在风湿性疾病中的应用研究还相对较少，相关的治疗机制还需要进一步探索<sup>[33]</sup>。

**2.2.6 其他** 除上述系统以外，携带 miRNA 的 MSC-Exo 还在缺血性股骨头坏死、椎间盘退变等疾病中得到了初步运用<sup>[34-38]</sup>。

### 3 总结与展望 Conclusions and prospects

综上所述，在各个系统领域中，围绕 MSC-Exo miRNA 的相关基础及临床前研究成果已日渐增多，成为干细胞及组织工程领域研究的热点之一。不同来源 MSC-Exo 可通过其携带的 miRNA 发挥促进细胞增殖、抑制细胞凋亡、促进血管生成等生物学作用，见表 1。利用基因工程技术对携带 miRNA 的 MSC-Exo 进行基因编辑，有望生产出针对相应疾病的组织工程非细胞生物制剂，为各领域疾病的临床治疗带来新的希望。

表 1 | 间充质干细胞来源外泌体通过传递 miRNA 在各系统疾病中的应用

系统	间充质干细胞来源 / 干预条件	所携带 miRNA	作用及机制	参引文献
心血管	中药“补阳还五汤”处理的大鼠骨髓来源	miR-126, miR-221, miR-222	促进血管内皮生长因子和 Ki-67 的表达，促进血管生成	YANG 等 <sup>[12]</sup>
	大鼠骨髓来源	miR-760-3p	靶向调控 Wnt1、Wnt9a、Egf、PDGFβ；增加大鼠心脏毛细血管密度，抑制心肌纤维化	ZHANG 等 <sup>[13]</sup>
	小鼠胚胎来源	“pro-angiomiRs”	促血管生成	GONG 等 <sup>[14]</sup>
	犬脐带来源 骨髓来源	miR-199, miR-21, let-7a, let-7b, miR-23a miR-214	促进血管内皮细胞的增殖、迁移，抑制内皮细胞凋亡 促进心肌微血管内皮细胞增殖	詹小舒等 <sup>[15]</sup> 李朝富等 <sup>[16]</sup>
神经	过表达心肌细胞转录因子(GATA-4)的小鼠骨髓来源	miR-330-3p	抑制 Ap2m1，降低心肌细胞凋亡率	贺继刚等 <sup>[17]</sup>
	骨髓来源	miR-146b	在大鼠脑中发挥抗肿瘤作用	KATAKOWSKI 等 <sup>[18]</sup>
	大鼠骨髓来源 骨髓来源	miR-17-92 miR-17-92, miR-21, miR-146a	激活 PTEN/mTOR 信号传导途径，促进神经元轴突生长 促进视网膜神经节细胞存活	ZHANG 等 <sup>[19]</sup> MEAD 等 <sup>[20]</sup>
消化	脂肪来源	miR-122	增加肝细胞癌的化疗敏感性，增加肝细胞癌对索拉非尼敏感性；抑制肝星状细胞的增殖并减轻胶原蛋白的沉积	LOU 等 <sup>[21-22, 24]</sup>
	脂肪来源	miR-199a	增加肝细胞癌对阿霉素敏感性	
	脂肪来源	miR-122	抑制肿瘤、抗纤维化，预防非酒精性脂肪肝病	BARANOVA 等 <sup>[25]</sup> , WU 等 <sup>[26]</sup>
内分泌	小鼠骨髓来源	let-7a, miR-23a, miR-125b	协同作用于 TLR4 /NF-κB 信号通路，将糖尿病小鼠坐骨神经中的炎症巨噬细胞转化为 M2 表型，改善糖尿病周围神经病变	FAN 等 <sup>[29]</sup>
免疫	大鼠骨髓来源	miR-21	降低脊髓组织中细胞凋亡率，减轻肥胖导致的创伤性脊髓损伤	JI 等 <sup>[30]</sup>
	脂多糖预处理的人脐带来源	let-7b	增加巨噬细胞抗炎细胞因子表达，并促进 M2 巨噬细胞的活化，减轻糖尿病大鼠皮肤伤口的炎症反应，加快伤口的愈合	TI 等 <sup>[31]</sup>
	脂肪来源	let-7a-5p, miR-16-5p, miR-23a-3p, miR-26a-5p, miR-101-3p, miR-103a-3p, miR-221-3p, miR-423-5p, miR-425-5p	促进骨关节炎模型伤口愈合	RAGNI 等 <sup>[32]</sup>

国内外目前对于 MSC-Exo 及其携带的 miRNA 在心血管系统、消化系统、神经系统、内分泌系统及免疫系统疾病的治疗作用已开展了较多的临床前实验研究, 揭示了许多新型 miRNA 在间充质干细胞修复组织损伤、预防及治疗相关疾病中的调控作用。就目前该领域的研究报道而言, 一部分研究仅分析了 MSC-Exo 中相关 miRNA 的表达情况, 并根据靶基因的预测及下游蛋白的表达水平对其在 MSC-Exo 作用过程中发挥的功能做了初步推断, 相关的基因功能及治疗效果还需要更加深入的探索; 此外, 鉴于 MSC-Exo 中 miRNA 含量的不稳定性会直接影响其临床应用价值, 当下迫切需要统一、标准化的 MSC-Exo 提取及鉴定流程来提高外泌体成分的稳定性, 这对于 MSC-Exo 走上临床应用至关重要。除上述系统以外, 未来对于携带 miRNA 的 MSC-Exo 在生殖系统、呼吸系统疾病中的作用还有待进一步探索。

**作者贡献:** 施沁、孙宝兰构思设计, 杨晓清、张玉泉审校, 施沁撰写、查阅文献并收集资料, 孙宝兰协助查阅并收集资料, 共同完成该综述。

**经费支持:** 该文章接受了“国家自然科学基金面上项目(81771527)”及“江苏省研究生科研与实践创新计划-科研计划项目(KYCX19\_2075)”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。

**写作指南:** 该研究遵守《系统综述和荟萃分析报告规范》(PRISMA 指南)。

**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。

**文章版权:** 文章出版前杂志已与全体作者授权人签署了版权相关协议。

**开放获取声明:** 这是一篇开放获取文章, 根据《知识共享许可协议》“署名-非商业性使用-相同方式共享 4.0”条款, 在合理引用的情况下, 允许他人以非商业性目的基于原文内容编辑、调整和扩展, 同时允许任何用户阅读、下载、拷贝、传递、打印、检索、超级链接该文献, 并为之建立索引, 用作软件的输入数据或其它任何合法用途。

## 4 参考文献 References

- [1] XIA J, MINAMINO S, KUWABARA K, et al. Stem cell secretome as a new booster for regenerative medicine. *Biosci Trends*. 2019;13(4):299-307.
- [2] LV K, LI Q, ZHANG L, et al. Incorporation of small extracellular vesicles in sodium alginate hydrogel as a novel therapeutic strategy for myocardial infarction. *Theranostics*. 2019;9(24):7403-7416.
- [3] LÄSSER C, JANG SC, LÖTVALL J. Subpopulations of extracellular vesicles and their therapeutic potential. *Mol Aspects Med*. 2018;60:1-14.
- [4] BOUTZ PL, CHAWLA G, STOILOV P, et al. MicroRNAs regulate the expression of the alternative splicing factor nPTB during muscle development. *Genes Dev*. 2007; 21(1):71-84.
- [5] GRECO SJ, RAMESHWAR P. MicroRNAs regulate synthesis of the neurotransmitter substance P in human mesenchymal stem cell-derived neuronal cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007;104(39):15484-15489.
- [6] PARK KS, BANDEIRA E, SHELKE GV, et al. Enhancement of therapeutic potential of mesenchymal stem cell-derived extracellular vesicles. *Stem Cell Res Ther*. 2019;10(1):288.
- [7] SHARIF S, GHAREMANI MH, SOLEIMANI M. Delivery of Exogenous miR-124 to Glioblastoma Multiform Cells by Wharton's Jelly Mesenchymal Stem Cells Decreases Cell Proliferation and Migration, and Confers Chemoresensitivity. *Stem Cell Rev Rep*. 2018;14(2):236-246.
- [8] STOOBVOGEL W. Functional transfer of microRNA by exosomes. *Blood*. 2012; 119(3):646-648.
- [9] CHEN TS, LAI RC, LEE MM, et al. Mesenchymal stem cell secretes microparticles enriched in pre-microRNAs. *Nucleic Acids Res*. 2010;38(1):215-224.
- [10] GNECCHI M, HE H, NOISEUX N, et al. Evidence supporting paracrine hypothesis for Akt-modified mesenchymal stem cell-mediated cardiac protection and functional improvement. *FASEB J*. 2006;20(6):661-669.
- [11] LAI RC, ARSLAN F, LEE MM, et al. Exosome secreted by MSC reduces myocardial ischemia/reperfusion injury. *Stem Cell Res*. 2010;4(3):214-222.

- [12] YANG J, GAO F, ZHANG Y, et al. Buyang Huanwu Decoction (BYHWD) Enhances Angiogenic Effect of Mesenchymal Stem Cell by Upregulating VEGF Expression After Focal Cerebral Ischemia. *J Mol Neurosci*. 2015;56(4):898-906.
- [13] ZHANG Z, YANG J, YAN W, et al. Pretreatment of Cardiac Stem Cells With Exosomes Derived From Mesenchymal Stem Cells Enhances Myocardial Repair. *J Am Heart Assoc*. 2016;5(1):e002856.
- [14] GONG M, YU B, WANG J, et al. Mesenchymal stem cells release exosomes that transfer miRNAs to endothelial cells and promote angiogenesis. *Oncotarget*. 2017;8(28):45200-45212.
- [15] 詹小舒, 罗惠娜, 罗冬章, 等. 犬脐带间充质干细胞来源外泌体对血管内皮细胞增殖、迁移和凋亡的调控作用 [J]. *中国组织工程研究*, 2019,23(29):4637-4643.
- [16] 李朝富, 王艳, 赵然尊, 等. 骨髓间充质干细胞源外泌体调控心肌血管内皮细胞增殖的机制研究 [J]. *第三军医大学学报*, 2019,41(23):2313-2321.
- [17] 贺继刚, 谢巧丽, 王梓豪, 等. 过表达心肌细胞转录因子骨髓间充质干细胞分泌外泌体抗心肌细胞凋亡的分子调控机制 [J]. *医学研究生学报*, 2019, 32(9):910-914.
- [18] KATAKOWSKI M, BULLER B, ZHENG X, et al. Exosomes from marrow stromal cells expressing miR-146b inhibit glioma growth. *Cancer Lett*. 2013;335(1):201-204.
- [19] ZHANG Y, CHOPP M, LIU XS, et al. Exosomes Derived from Mesenchymal Stromal Cells Promote Axonal Growth of Cortical Neurons. *Mol Neurobiol*. 2017;54(4): 2659-2673.
- [20] 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(4):1273-1285.
- [21] 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.
- [22] LOU G, CHEN L, XIA C, et al. MiR-199a-modified exosomes from adipose tissue-derived mesenchymal stem cells improve hepatocellular carcinoma chemosensitivity through mTOR pathway. *J Exp Clin Cancer Res*. 2020;39(1):4.
- [23] CALLEGARI E, D'ABUNDO L, GUERRIERO P, et al. miR-199a-3p Modulates MTOR and PAK4 Pathways and Inhibits Tumor Growth in a Hepatocellular Carcinoma Transgenic Mouse Model. *Mol Ther Nucleic Acids*. 2018;11:485-493.
- [24] LOU G, YANG Y, LIU F, et al. MiR-122 modification enhances the therapeutic efficacy of adipose tissue-derived mesenchymal stem cells against liver fibrosis. *J Cell Mol Med*. 2017;21(11):2963-2973.
- [25] BARANOVA A, MALTSEVA D, TONEVITSKY A. Adipose may actively delay progression of NAFLD by releasing tumor-suppressing, anti-fibrotic miR-122 into circulation. *Obes Rev*. 2019;20(1):108-118.
- [26] WU GY, RUI C, CHEN JQ, et al. MicroRNA-122 Inhibits Lipid Droplet Formation and Hepatic Triglyceride Accumulation via Yin Yang 1. *Cell Physiol Biochem*. 2017;44(4):1651-1664.
- [27] MCCULLOH CJ, OLSON JK, WANG Y, et al. Treatment of experimental necrotizing enterocolitis with stem cell-derived exosomes. *J Pediatr Surg*. 2018;53(6):1215-1220.
- [28] CALLAGHAN BC, LITTLE AA, FELDMAN EL, et al. Enhanced glucose control for preventing and treating diabetic neuropathy. *Cochrane Database Syst Rev*. 2012; 6(6):CD007543.
- [29] FAN B, LI C, SZALAD A, et al. Mesenchymal stromal cell-derived exosomes ameliorate peripheral neuropathy in a mouse model of diabetes. *Diabetologia*. 2020;63(2):431-443.
- [30] JI W, JIANG W, LI M, et al. miR-21 deficiency contributes to the impaired protective effects of obese rat mesenchymal stem cell-derived exosomes against spinal cord injury. *Biochimie*. 2019;167:171-178.
- [31] TI D, HAO H, TONG C, et al. LPS-preconditioned mesenchymal stromal cells modify macrophage polarization for resolution of chronic inflammation via exosome-shuttled let-7b. *J Transl Med*. 2015;13:308.
- [32] RAGNI E, DE LUCA P, PERUCCA ORFELI C, et al. Insights into Inflammatory Priming of Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells: Validation of Extracellular Vesicles-Embedded miRNA Reference Genes as A Crucial Step for Donor Selection. *Cells*. 2019;8(4):369.
- [33] COSENZA S, RUIZ M, MAUMUS M, et al. Pathogenic or Therapeutic Extracellular Vesicles in Rheumatic Diseases: Role of Mesenchymal Stem Cell-Derived Vesicles. *Int J Mol Sci*. 2017;18(4):889.
- [34] 李毅. MSC 源性外泌体对糖尿病骨缺损愈合作用的初步研究 [D]. 北京: 中国人民解放军医学院, 2018.
- [35] 苏永蔚, 周山健, 肖大伟, 等. 负载 miRNA-27b 的 BMSCs 来源的外泌体治疗实验性骨关节炎 [J]. *中国矫形外科杂志*, 2019,27(8):726-734.
- [36] 周山健. 负载 miR-126 的外泌体对大鼠早期激素诱导的缺血性股骨头坏死的治疗作用 [D]. 锦州: 锦州医科大学, 2018.
- [37] 方硕. 干细胞来源的外泌体对成纤维细胞向肌成纤维细胞分化的调控作用及其机制研究 [D]. 上海: 第二军医大学, 2016.
- [38] 顾威. 间充质干细胞外泌体通过抑制 BACH1 促进 HO-1 影响椎间盘退变的机制研究 [D]. 上海: 中国人民解放军海军军医大学, 2018.

(责任编辑: MZH, ZN, JY)