

DOI: 10.3969/j.issn.1673-713X.2019.04.013

# 人间充质干细胞外泌体研究进展

缪着, 卢福琼, 马波, 刘馨

外泌体是一种能被大多数细胞分泌的微小膜泡, 具有脂质双层膜结构, 直径为 40 ~ 100 nm, 密度为 1.13 ~ 1.18 g/ml。随着以干细胞技术为核心的再生医学的发展, 间充质干细胞 (mesenchymal stem cell, MSC) 被广泛应用于多种疾病的治疗, 研究表明, MSC 来源的外泌体通过核内体途径产生, 能够起到与干细胞相似的生理作用, 能够保护肾脏损伤、减少心肌缺血和再灌注损伤、保护内毒素诱导的肺损伤、调节免疫系统功能等<sup>[1]</sup>。在早期的研究中, 人们将 MSC 的治疗效果归因于局部移植和分化为各种类型细胞的能力, 但随着研究的进一步深入, 人们发现 MSC 移植入体内后, 不能长期存活, 大部分细胞在血管中死亡。所以, 推测产生的治疗作用可能是依赖于旁分泌机制产生的大量生物活性因子。大多数健康或疾病环境的细胞能够持续释放细胞外囊泡 (extracellular vesicles, EV) 进入周围环境, 其中外泌体作为细胞间进行信息交流的重要工具有望替代干细胞移植。MSC 来源的外泌体已进入临床试验阶段, 主要针对急性缺血性脑中风、难治性黄斑孔裂、1 型糖尿病和阿尔茨海默症。因此, 对外泌体的培养方法和相关参数、分离方法进行改进和优化, 对其蛋白质和核酸进行严格分析均是其应用于临床的基础。本文对人 MSC 外泌体的产生机制、内容物、获取方法进行了综述。

## 1 MSC 外泌体的生成机制

MSC 来源的外泌体通过核内体途径产生, 不同细胞来源外泌体有相似的合成路径<sup>[2]</sup>。该过程始于细胞膜表面的内吞作用形成的早期内吞体, 早期内吞体再成熟为晚期内吞体, 晚期内吞体膜通过内向出芽作用, 包裹特异分选的蛋白、核酸等物质形成多个管腔囊泡 (ILVs), 这种管腔囊泡即为外泌体的前体。晚期内吞体内包含多个 ILVs 后, 即成为多泡体 (MVB)。随后, 大多数 MVB 与溶酶体融合, 导致 MVB 的内含物降解, 而少数 MVB 的膜表面有 CD63、溶酶体跨膜蛋白 (lysosomal membrane protein, LAMP) 1、LAMP2 等, 可介导其与细胞质膜融合, 并向胞外释放外泌体<sup>[3-4]</sup>。

### 1.1 依赖内吞体分选复合物机制

ILVs 与 MVB 的生成需要内吞体分选复合物 (endosomal sorting complex required for transport, ESCRT) 的辅助。ESCRT 是一种蛋白复合物, 定位于内吞体胞质侧, 其主要作用为分选特异的组分进入 ILVs, 进而构成外泌体的前体。ESCRT 包含了四种复合体 (ESCRT-0、I、II、III) 及辅助蛋白 (VPS4、VTA1、ALIX 等), 各自发挥着不同的作用。四种复合体在生成 ILVs 和 MVB 的过程中发挥

的作用各不相同, ESCRT-0 识别和分隔泛素化标记的内吞体膜跨膜蛋白, 含有肝细胞生长因子调控的酪氨酸激酶, 后者可以识别泛素化的蛋白; HRS 可以募集 ESCRT-I 中的 TSG-101, 而后 ESCRT-I 通过 ESCRT-II 或 ALIX 蛋白的作用募集 ESCRT-III 发挥作用, 使内吞体膜通过内向生芽作用包裹特异的内容物; ESCRT-III 将形成的囊泡剪开。此外, ESCRT 的解离和再循环需要 ATP 酶 VPS4 的辅助作用, ESCRT-0、ESCRT-I 和 VPS4 在外泌体的生成中具有重要作用, 且不同细胞的外泌体生成存在异质性<sup>[5-6]</sup>。

### 1.2 非依赖内吞体分选复合物机制

细胞不依赖 ESCRT 也可生成 ILVs 及 MVB。通过脂质、神经酰胺、四跨膜蛋白家族 tetraspanins 或热休克蛋白等的作用辅助生成 ILVs 及 MVB。Tan 等<sup>[7]</sup>利用鞘磷脂酶抑制剂处理 MSC, 证明外泌体的产生依赖于鞘磷脂酶, 这与 MVB 内泌体出芽需要神经酰胺的假设是一致的。中性鞘磷脂酶可以水解鞘磷脂生成神经酰胺, 而抑制该酶的作用可减少神经酰胺的生成, 进而降低 MVB 膜的内向生芽作用, 减少外泌体的生成。磷脂酶 D2 可将卵磷脂水解生成磷脂酸, 磷脂酸可以像神经酰胺一样促进 MVB 膜的内向生芽作用, 并包裹特异的蛋白生成 ILVs, 促进外泌体的生成<sup>[8]</sup>。上述表明, 磷脂酸和神经酰胺可以不依赖 ESCRT 的作用而生成外泌体。ADP 核糖基化因子 6 是质膜及内吞体膜上的一种小 G 蛋白, 可激活磷脂酶 D2, 使卵磷脂水解生成磷脂酸。目前, tetraspanin 蛋白超家族分选外泌体内含物的作用也已被阐明。此外, 有研究发现 CD81 也可分选一系列配体等进入外泌体<sup>[5]</sup>。

## 2 MSC 外泌体的组分及生物学功能

细胞外囊泡 (EV) 是细胞主动释放的纳米级膜泡, 可以根据其来源、大小与生物学特性分为三类: 外泌体、微囊和凋亡小体<sup>[9]</sup>, 如表 1 所示。

1983 年, Johnstone 等首次在绵羊网织红细胞中发现外泌体, 但一直被认为是一种细胞废弃物。2010 年 MSC 来源外泌体首次在心肌缺血/再灌注损伤模型中被研究。研究表明, 骨髓 MSC 比成肌细胞、人急性单核细胞白血病细胞系 (THP-1)、人胚胎肾细胞系 (HEK) 等能产生更多的

作者单位: 650500, 昆明医科大学药学院暨云南省天然药物药理重点实验室 (缪着、卢福琼、马波、刘馨); 653100 玉溪, 云南时光肌生物技术有限公司 (马波、刘馨)

通信作者: 刘馨, Email: fluidstar@126.com

收稿日期: 2019-05-22

表 1 细胞外囊泡的主要类型

细胞外囊泡	大小 (nm)	密度 (g/ml)	来源	标记
外泌体	40~100	1.13~1.18	核内体	Tetraspanins, Alix, TSG101
微囊	200~2000	1.16~1.19	细胞质膜	Integrins, selectins, CD40
凋亡小体	500~2000	1.16~1.28	细胞质膜内质网	Phosphatidylserine, genomic DNA

外泌体。MSC 来源的微囊对部分组织器官也有再生功能,包括肾脏、神经组织、肝脏和肺<sup>[10]</sup>。外泌体外层结构为磷脂双分子层,表面携带有来源细胞特定的膜结构物质,内容物丰富,例如蛋白质、脂质和核酸,通过靶细胞内化、受体-配体相互作用或脂膜融合进行传递<sup>[11-12]</sup>。根据外泌体最新数据库 (<http://www.exocarta.org/>),已确定其中存在有 9769 种蛋白质、3408 种 mRNA 和 2838 种 miRNA。

### 2.1 蛋白质

外泌体中的蛋白来源于母细胞、内吞途径和细胞质,与细胞内吞网络相关,通常不包含内质网、线粒体或细胞核蛋白质。MSC 外泌体除表达所有外泌体共同表达的标志物之外,还表达 MSC 细胞膜上的一些黏附分子,如 CD29、CD44、CD73、CD90、CD105<sup>[13-14]</sup>。另外还存在一些其他种类的蛋白,例如:可作为标记并用于外泌体鉴定的多泡体源蛋白(例如 Alix 和 TSG101);与维持细胞结构相关的细胞骨架蛋白(例如肌动蛋白和微管蛋白);可以调节膜骨架的动态性以及膜融合的膜联蛋白(I、II、V 和 VI);与信号转导相关的转导蛋白、与细胞代谢相关的载体蛋白和一些组织相容性抗原也广泛存在于外泌体中<sup>[15]</sup>。据 ExoCarta 介绍,已经从 MSC 来源外泌体中收集了 900 多种蛋白质。与其他细胞来源外泌体相似, MSC 外泌体的蛋白组成可以反映宿主细胞的生理和病理状态,也可以随应激和微环境的变化而变化,从不同批次 MSC 条件培养基获得的外泌体的蛋白成分存在差异。

### 2.2 脂质

MSC 外泌体具有脂筏结构的特征,是一个在质膜中具有内吞活性的微结构域。脂筏富含胆固醇和饱和磷脂,如鞘磷脂等<sup>[7]</sup>。鞘脂神经酰胺已被证明与外泌体产生有关。从 MSC 外泌体中分离得到的脂肪酸包括白三烯、花生四烯酸(AA)、磷脂酸、前列腺素溶血磷脂酰胆碱(LPC)和二十二碳六烯酸(DHA)<sup>[16]</sup>。外泌体中所含有的脂质成分与其来源细胞的种类有很大关系,也存在一定的差异。这些脂类分子不仅参与了维持外泌体的形态,还可以作为信号分子参与许多生物学过程。如:对 Notch 等肿瘤生存信号通路的抑制,引起细胞凋亡,以及对前列腺素、磷酸激酶 A2、磷酸激酶 C 和磷酸激酶 D 等中间信号分子的传递,参与细胞间通讯<sup>[17]</sup>。虽然脂质在囊泡稳定性中起着重要作用,但 MSC 外泌体脂质的生物学和药理作用仍有待进一步阐明<sup>[16]</sup>。

### 2.3 核苷酸

外泌体含有大量具有生物活性的遗传学物质,这是把外泌体与囊泡区分开来的最重要特征。MSC 外泌体内的核酸主要有 miRNA 和 mRNA。许多 miRNA 已经被发现在

MSC 来源外泌体中参与生理和病理过程,如机体发育、表观遗传调控、免疫调节、肿瘤发生和进展<sup>[18]</sup>。mRNA 可以参与细胞周期、血管生成及组蛋白修饰等进程<sup>[19]</sup>。miR-16 是一种在 MSC 来源外泌体中富集的 miRNA,靶向体内和体外肿瘤中血管内皮生长因子(VEGF),下调其表达来抑制血管生成和肿瘤进展<sup>[20]</sup>。从脐带 MSC 衍生的外泌体中释放的 let-7f、miR-145、miR-199a 和 miR-221 在很大程度上有助于抑制丙型肝炎病毒<sup>[21]</sup>。miR-21 是一种抗凋亡 miRNA,在 MSC 外泌体中浓度最高。MSC 外泌体通过促进肌生成和血管生成促进肌肉再生,是由 miR-494 等 miRNA 介导的<sup>[10]</sup>。脂肪 MSC 外泌体中最丰富的 5 种 miRNA 是 miR-486-5p、miR-10a-5p、miR-10b-5p、miR-191-5p 和 miR-222-3p;而骨髓 MSC 外泌体中 miR-143-3p、miR-10b-5p、miR-486-5p、miR-22-3p、miR-21-5p 占 miRNA 总量的 43%~59%<sup>[22]</sup>。另外,外泌体也含有少量线粒体 DNA(mtDNA)、piRNA、长链非编码 RNA(lncRNA)、核糖体 RNA(rRNA)、snRNA、snoRNA 和 tRNA<sup>[4]</sup>。

## 3 MSC 外泌体的获取

### 3.1 离心法

为了开发外泌体在诊断和治疗中的应用,建立一个有效的方式来分离外泌体,且最小限度地改变它们的结构和含量是十分必要的。目前公认的黄金标准是差速超速离心。差速超速离心法利用不同蛋白质分子及囊泡、细胞及细胞碎片等在均匀悬浮液中的沉降速度存在差异,通过逐渐增强离心力和离心时间来分离细胞、碎片和细胞器等,从而得到外泌体<sup>[23]</sup>。一般采用 300 × g 离心 10 min, 2000 × g 离心 10 min 去除死亡细胞, 10 000 × g 离心 20 min 去除细胞碎片和大分子蛋白质, 100 000 × g 离心 2 h 得到目的微球,然后用 0.22 μm 滤膜过滤除去凋亡小体和微囊。杨向荣等<sup>[24]</sup>将生长良好的 P<sub>3</sub> 至 P<sub>5</sub> 脐带 MSC 在 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 饱和湿度的培养箱中使用无血清培养 48 h,收集上清液,4 °C 保存放置过夜,采用上述方法分离外泌体,在 -80 °C 冻存。

高速离心法往往不能区分外泌体、小的囊泡以及部分蛋白质,通常配合蔗糖密度梯度法提高外泌体纯度。外泌体和其他所有脂质囊泡一样漂浮在蔗糖梯度中,其密度范围从 1.13 g/ml (B 细胞来源外泌体)~1.19 g/ml (肠道细胞来源外泌体),凋亡细胞释放的蛋白质和核酸碎片等杂质漂浮在蔗糖密度梯度中,经高速离心分离达到纯化的目的<sup>[23]</sup>。

目前,离心法提取外泌体还有待进一步确立标准,不同的转速、离心力、离心时间和样本性质均可能导致结果不同。

### 3.2 沉淀法

聚乙二醇 (polyethylene glycol, PEG) 具有极强的亲水性, 可与疏水性的脂质双分子层结合, 改变外泌体的溶解度或分散性使其沉淀。可以用于血清、血浆、腹水、尿液外泌体的分离, 一般配合离心法和 0.22  $\mu\text{m}$  滤膜来提高外泌体的纯度。梁亚会等<sup>[25]</sup>建立了一种利用 PEG 6000 溶液低速离心从骨髓 MSC 培养上清中分离外泌体的方法。将细胞培养上清于常温  $3000 \times g$  离心 20 min, 去除细胞及细胞碎片, 收集上清 0.22  $\mu\text{m}$  滤膜过滤除去大的颗粒及囊泡, 加入 8%  $5 \times \text{PEG 6000}$  试剂, 4  $^{\circ}\text{C}$  静置过夜后,  $3000 \times g$  离心 30 min, 弃上清, 离心管倒扣于吸水纸上风干 5~10 min, 根据沉淀的量加入适量的 PBS 重悬, 再次  $5000 \times g$  离心 20 min, 弃上清, 根据获得外泌体的量加入适量 PBS 重悬, 即获得骨髓 MSC 外泌体。

基于沉淀原理的试剂盒均加入了 PEG, 先低速离心去除细胞碎片和蛋白质颗粒, 再加入试剂混合均匀, 静置一段时间后离心得到外泌体。郭莹等<sup>[26]</sup>对差速离心法、Exo Quick 试剂盒法、Total Exosome Isolation 试剂盒法提取人脐带 MSC 外泌体进行比较, 差速超速离心法提取的外泌体中的蛋白浓度和纯度最高, Exo Quick 试剂盒法其次, Total Exosome Isolation 试剂盒法得到的蛋白浓度最低; 但差速离心法和 Total Exosome Isolation 试剂盒法耗时长。不同品牌的外泌体提取试剂盒的用法和用量都会存在差异, 具体提取方法应根据说明书进行操作。

### 3.3 超滤法

超滤法是根据外泌体的大小使用相应截流分子量的超滤膜, 配合离心或加压来分离外泌体。该法通过离心和压力收集到的外泌体差异较大。近来, Lobb 等<sup>[27]</sup>指出, 50~200 ml 样本更适合采用离心法, 当样本量达到 400 ml 以上时更适合采用压力法。胡国文等<sup>[28]</sup>采用旋转超滤技术从骨髓 MSC 培养上清中分离外泌体。按离心法除去细胞碎片, 以及 0.22  $\mu\text{m}$  滤膜过滤后, 将上清液加入装有 100000NW-CO 超滤膜的 Model 8050 旋转超滤仪中, 接通氮气, 并将最大通气压力控制在 517.125 kPa 以下, 打开磁力搅拌器, 使漩涡高度为液体高度的 1/3, 待上清液超滤完毕后, 加入 50 ml PBS 再次超滤, 重复 3 次。超滤完毕后, 用 0.5 ml PBS 悬浮超滤

膜上的外泌体, 转移至 EP 管中, 放  $-80^{\circ}\text{C}$  冻存。基于外泌体的粒径、蛋白质和脂质与物料间的相互作用力, 采用凝胶渗透色谱柱能实现外泌体与杂质的高效分离, 但色谱柱不能反复多次使用, 限制了该方法的发展<sup>[29]</sup>。

### 3.4 抗体亲和捕获法

用磁性粉末包被的单克隆抗体微颗粒, 能与外泌体膜表面蛋白特异性结合。王静等<sup>[30]</sup>用免疫磁珠法分选脂肪间充质干细胞外泌体, 使用 CD81 标记的磁性微珠, 与 PBS 和外泌体按一定比例混合, 在  $2 \sim 8^{\circ}\text{C}$  条件下孵育过夜, 第 2 天离心收集管底沉淀, 得到免疫磁珠-外泌体复合物, PBS 洗涤后可用于流式细胞检测。

### 3.5 微流控技术分离法

微流控技术是 2012 年以后发展起来的外泌体分离新技术, 可分为免疫亲和、筛分、多孔结构捕获三类<sup>[31]</sup>。因其对小体积样本的处理能力以及对生物颗粒的分离能力而引起广泛关注, 在生物医学研究、分析化学、分子化学等领域得到广泛应用<sup>[32]</sup>。免疫分离是通过表面带有人字形凹槽的固定装置, 依赖于外泌体表面的受体, 使其与装置表面特异性抗体结合, 再用适当的洗脱液洗脱, 使其与其他脱落膜颗粒和脂质结构分离。依据 MSC 外泌体的表面标记, 可选择相应抗体进行特异性收集。上述几种分离外泌体方法的优缺点比较详见表 2。

## 4 体外培养人 MSC 外泌体的临床应用研究

MSC 来源于发育早期的中胚层和外胚层, 属于多功能干细胞, 其具有多向分化潜能、造血支持、免疫调控和自我复制等特点, 是干细胞家族的重要成员, 存在于骨髓、肝脏、脾脏、成人的骨骼肌、外周血、脂肪、韧带、胎盘、脐带、脐血、皮肤等组织中。2006 年国际间充质及组织干细胞委员会对来源 MSC 实验研究提出 3 条最低鉴定标准: ①在标准培养条件下, MSC 必须具备对塑料底物的贴附特性; ②通过流式细胞仪检测, MSC 群体表达 CD105、CD73 及 CD90 阳性率  $\geq 95\%$ , 且 CD45、CD34、CD14 或 CD11b、CD79a 或 CD19、HLA-DR 的阴性表达率  $\geq 98\%$ ; ③在体外, 通过标准方法诱导, MSC 必须能向成骨细胞、脂肪细胞及软骨细胞分化。

表 2 外泌体的分离方法比较

技术	具体方法	优点	缺点	文献
离心法	超速差速离心法、蔗糖密度梯度离心法	金标准、样本量大、纯度高、应用广泛	费时、费力, 回收率不高, 超高速离心会破坏外泌体结构	[23-24]
沉淀法	沉淀试剂盒法	操作方便、不需要专业设备、可用于大容量样本	可能会沉淀非外泌体的疏水性物质、蛋白纯度不高、颗粒大小不均匀	[25-26]
超滤法	微孔膜过滤、超滤、排阻色谱	操作简单、快速、回收率高、设备成本低; 排阻色谱能够维持外泌体结构和完整性	滤膜易损耗和变形、堵塞可能性大(易附着于膜上)、纯度低; 排阻色谱法需要特殊装备、运行时间长	[28-29]
抗体亲和捕获法	免疫磁珠法	特异性高、纯度高、可分离不同亚型的外泌体	适用范围小(仅适用于无细胞样品)、成本高、产量低	[30]
微流控技术	微流控芯片法	快速、低成本、便携、可自动化控制、回收率好	缺乏标准化和大规模临床样本测试, 缺乏方法验证	[31-32]

MSC 经过体外培养后, 细胞体积增大、归巢能力降低以及移植入体内的生存能力较差。使用外泌体进行无细胞治疗比基于干细胞的应用提供了以下优势: ①解决了可能与活细胞和增殖细胞群移植相关的若干安全隐患, 包括免疫相容性、致瘤性、栓塞和感染传播; ②可以在不使用潜在毒性的冷冻保护剂的情况下长期保存而不会丧失产品效力, 即在储存、处理和保质期方面有更大的优势; ③在受控的实验室条件下通过特定的细胞系可以大规模生产, 且来自“好细胞”的外泌体携带许多 MSC 的再生蛋白; ④外泌体符合纳米颗粒的定义, 体积相对较小, 因此更容易穿过血脑屏障到达大脑的缺血区域或疾病位点; ⑤外泌体中的内容物可以通过不同的培养条件来控制, 在未来的研究中, 可以通过对培养条件进行实施和修订, 以扩增具有定制治疗特性的 MSC 来源外泌体的产品<sup>[33]</sup>。

在北美临床试验注册中心 (<http://clinicaltrials.gov>) 上可以检索到与 MSC 来源外泌体相关的临床试验有 4 项, 分别为评估其通过富集 miR-124 对急性缺血性脑卒中的治疗作用、通过 miRNA-136,494,495 在外泌体内的表达来提早预测子痫前期、比较 MSCs 及其来源外泌体对难治性黄斑裂孔的促愈合作用以及评估微泡和外泌体在治疗 1 型糖尿病和  $\beta$ -细胞缺失中的效果。除此之外, MSC 来源外泌体也运用于靶向治疗、载药、组织修复、神经疾病治疗、免疫调节、肿瘤抑制等方面<sup>[34]</sup>。研究表明, MSC 外泌体含有细胞因子和细胞因子生长因子, 如 TGF $\beta$ 1、白细胞介素-6(IL-6)、IL-10 和肝细胞生长因子(HGF), 有助于免疫调节<sup>[11]</sup>。MSC 外泌体中还包括 VEGF、细胞外基质金属蛋白酶诱导物 (EMMPRIN)、MMP-9 这三种蛋白质, 对促血管生成起重要作用, 也是组织修复的基础。MSC 来源外泌体也是合适的递药系统, 是天然的纳米颗粒, 且具有修饰的可塑性, 人们还尝试通过基因转染技术进行外泌体表面修饰, 提高组织靶向性和治疗效果<sup>[35]</sup>。所以, 外泌体的治疗作用要广泛的运用于临床, 仍需要临床试验的进一步验证和支持。

## 5 体外培养条件对人 MSC 外泌体的影响

临床试验中可能需要数百微克至毫克的外泌体来治疗患者, 原代 MSC 数量很少, 可以通过体外扩增培养, 控制培养微环境来增加外泌体的产量和诱导有效成分的高表达。目前常用的培养细胞产生 EVs 体系有 2D 培养体系、3D 培养体系 (包括支架和无支架) 和生物反应器<sup>[36]</sup>。3D 培养体系可以弥补传统 2D 培养体系在生理模式方面的缺失, 但 3D 培养体系其支架组成会影响 EVs 的数量和质量, 且更难去评估, 再现性和可伸缩性也应该被考虑, EVs 的分离需要用酶进行消化, 会影响 EV 的完整性和生物活性。生物反应器的优点在于 EV 的产量大, 且在动态条件下培养, 可以增强生物反应系统内的营养交换, 但也必然会给 EV 的功能和特性带来影响, 例如, 细胞接种的密度、老化程度、增殖代数、分化的不同时期、培养基基质的形貌、刚性、流体剪切应力以及周期性拉伸等细胞培养微环境下的

因素均会对 EV 产生影响。细胞接种密度过大, 会产生接触抑制。长期的体外培养会加速 MSC 的老化, 从而影响其可塑性和遗传稳定性, 并反映在 EV 的内容物上。细胞分化的不同阶段分离出来的 EV 的 miRNA 的表达水平也不同。培养基质的沟槽和脊线会影响 MSC 的扩散和定向, 使其朝向特定的谱系分化。培养基质的刚性也会影响细胞的表型。除此之外, 在缺氧条件下培养细胞, 会增加生长因子和抗炎分子的产生<sup>[37]</sup>。Moon 等<sup>[38]</sup>通过脑缺血组织提取物 (IBE) 处理刺激 MSCs 释放 EV, 以模拟脑缺血生物化学微环境, 可以成功获得大量具有多种神经源性和血管生成因子的 MSC 来源 EV, 用于治疗卒中。

## 6 问题与展望

人 MSC 外泌体可以用作无细胞成分的再生性药物, 主要是基于其质量、复制性以及它们的制备过程, 在同种方式下, 这些参数也反映了基于人 MSC 治疗的效果。因此, MSC 外泌体应用于临床仍存在以下问题: ①外泌体成分并不是静态的, 是 MSC 活动及其细胞间通讯所产生的, 可被靶细胞内化后, 改变其生物学性能。在人 MSC 与肿瘤细胞共培养或者处于体内肿瘤微环境下, 外泌体的成分也会发生改变。所以, 在 MSC 外泌体的制备过程中, 培养环境及参数决定了外泌体的生物学作用; ②外泌体内容丰富, 但具体的有效成分及作用机制仍待进一步开发研究; ③外泌体获取方法差异性较大, 需要进一步优化提高其产量和纯度。总而言之, 涉及 MSC 来源外泌体质量控制的标准化协议应该被构思并有效应用于临床, 包括: ①体外培养 MSC 产生外泌体的定向培养方法及相关参数; ②外泌体理想的纯化获取方法; ③外泌体的物理特性和标准化表征; ④外泌体中脂质、蛋白质和 miRNA 的分析标准。

综上所述, MSC 外泌体克服了细胞移植存在的问题, 来源更广, 保存、运输更方便, 能够起到与干细胞相似的作用, 且有望通过明确有效成分后, 在培养过程中诱导其特异性高表达, 开发针对特定疾病的外泌体产品, 使“无细胞”治疗有望替代干细胞治疗, 成为干细胞与再生医学领域的重要研究方向之一。

## 参考文献

- [1] Börger V, Bremer M, Görgens A, et al. Mesenchymal stem/stromal cell-derived extracellular vesicles as a new approach in stem cell therapy. *ISBT Sci Ser*, 2016, 11(S1):228-234.
- [2] Kowal J, Tkach M, Théry C. Biogenesis and secretion of exosomes. *Curr Opin Cell Biol*, 2014, 29:116-125.
- [3] Vlassov AV, Magdaleno S, Setterquist R, et al. Exosomes: current knowledge of their composition, biological functions, and diagnostic and therapeutic potentials. *Biochim Biophys Acta*, 2012, 1820(7):940-948.
- [4] Vakhshiteh F, Atyabi F, Ostad SN. Mesenchymal stem cell exosomes: a two-edged sword in cancer therapy. *Int J Nanomedicine*, 2019, 14:2847-2859.
- [5] Frydrychowicz M, Kolecka-Bednarczyk A, Madejczyk M, et al.

- Exosomes - structure, biogenesis and biological role in non-small-cell lung cancer. *Scand J Immunol*, 2015, 81(1):2-10.
- [6] Colombo M, Raposo G, Théry C. Biogenesis, secretion, and intercellular interactions of exosomes and other extracellular vesicles. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 2014, 30:255-289.
- [7] Tan SS, Yin Y, Lee T, et al. Therapeutic MSC exosomes are derived from lipid raft microdomains in the plasma membrane. *Journal of Extracellular Vesicles*, 2013, 2(1):22614.
- [8] Ghossoub R, Lembo F, Rubio A, et al. Syntenin-ALIX exosome biogenesis and budding into multivesicular bodies are controlled by ARF6 and PLD2. *Nat Commun*, 2014, 5:3477.
- [9] Shao H, Im H, Castro CM, et al. New technologies for analysis of extracellular vesicles. *Chem Rev*, 2018, 118(4):1917-1950.
- [10] Nakamura Y, Miyaki S, Ishitobi H, et al. Mesenchymal-stem-cell-derived exosomes accelerate skeletal muscle regeneration. *FEBS Lett*, 2015, 589(11):1257-1265.
- [11] Yin S, Ji C, Wu P, et al. Human umbilical cord mesenchymal stem cells and exosomes: bioactive ways of tissue injury repair. *Am J Transl Res*, 2019, 11(3):1230-1240.
- [12] Liu Z, Xu Y, Wang Y, et al. Exosomes from adipose-derived mesenchymal stem cells prevent cardiomyocyte apoptosis induced by oxidative stress. *Cell Death Discov*, 2019, 5:79.
- [13] Cheng L, Zhang K, Wu S, et al. Focus on mesenchymal stem cell-derived exosomes: opportunities and challenges in cell-free therapy. *Stem Cells Int*, 2017, 2017:6305295.
- [14] Bobrie A, Colombo M, Raposo G, et al. Exosome secretion: molecular mechanisms and roles in immune responses. *Traffic*, 2011, 12(12):1659-1668.
- [15] Beach A, Zhang HG, Ratajczak MZ, et al. Exosomes: an overview of biogenesis, composition and role in ovarian cancer. *J Ovarian Res*, 2014, 7:14.
- [16] Deng H, Sun C, Sun Y, et al. Lipid, protein, and MicroRNA composition within mesenchymal stem cell-derived exosomes. *Cell Reprogram*, 2018, 20(3):178-186.
- [17] Record M, Carayon K, Poirrot M, et al. Exosomes as new vesicular lipid transporters involved in cell-cell communication and various pathophysiological. *Biochim Biophys Acta*, 2014, 1841(1):108-120.
- [18] Yu B, Zhang X, Li X. Exosomes derived from mesenchymal stem cells. *Int J Mol Sci*, 2014, 15(3):4142-4157.
- [19] Zöller M. Pancreatic cancer diagnosis by free and exosomal miRNA. *World J Gastrointest Pathophysiol*, 2013, 4(4):74-90.
- [20] Lee JK, Park SR, Jung BK, et al. Exosomes derived from mesenchymal stem cells suppress angiogenesis by down-regulating VEGF expression in breast cancer cells. *PLoS One*, 2013, 8(12):e84256.
- [21] Qian X, Xu C, Fang S, et al. Exosomal micRNAs derived from umbilical mesenchymal stem cells inhibit hepatitis C virus infection. *Stem Cells Transl Med*, 2016, 5(9):1190-1203.
- [22] Baglio SR, Rooijers K, Koppers-Lalic D, et al. Human bone marrow and adipose-mesenchymal stem cells secrete exosomes enriched in distinctive miRNA and tRNA species. *Stem Cell Res Ther*, 2015, 6:127.
- [23] Suchi G, Sonali R, Vivek A, et al. An improvised one-step sucrose cushion ultracentrifugation method for exosome isolation from culture supernatants of mesenchymal stem cells. *Stem Cell Res Ther*, 2018, 9(1):180.
- [24] Yang XR, Ding J, Xu ZY, et al. Biological characteristics of exosomes secreted by human umbilical cord-derived mesenchymal stromal cells. *Acta Med Univ Sci Technol Huazhong*, 2016, 45(2):154-159. (in Chinese)
- 杨向荣, 丁娟, 徐正阳, 等. 人脐带间充质干细胞来源外泌体的生物学特性研究. *华中科技大学学报(医学版)*, 2016, 45(2):154-159.
- [25] Liang YH, Guo ZK, Wang F, et al. A quick method of isolating exosomes from mesenchymal stem cells using PEG 6000. *Med J Air Force*, 2017, 33(3):176-179. (in Chinese)
- 梁亚会, 郭子宽, 王芳, 等. PEG 6000 快速提取间充质干细胞外泌体. *空军医学杂志*, 2017, 33(3):176-179.
- [26] Guo Y, Wang XW, Niu YH, et al. Comparison of exosome extracting methods from human umbilical cord mesenchymal stem cells. *Chin J Tissue Eng Res*, 2018, 22(9):1382-1388. (in Chinese)
- 郭莹, 王秀伟, 牛玉虎, 等. 人脐带间充质干细胞来源外泌体提取方法的比较. *中国组织工程研究*, 2018, 22(9):1382-1388.
- [27] Lobb RJ, Becker M, Wen SW, et al. Optimized exosome isolation protocol for cell culture supernatant and human plasma. *J Extracell Vesicles*, 2015, 4:27031.
- [28] Hu GW, Li Q, Niu X, et al. Stirring ultrafiltration: a new method for isolate exosomes. *Acad J Second Milit Med Univ*, 2014, 35(6):598-602. (in Chinese)
- 胡国文, 李青, 牛鑫, 等. 旋转超滤: 一种提取细胞外泌体的新方法. *第二军医大学学报*, 2014, 35(6):598-602.
- [29] Koh YQ, Almughliq FB, Vaswani K, et al. Exosome enrichment by ultracentrifugation and size exclusion chromatography. *Front Biosci (Landmark Ed)*, 2018, 23:865-874.
- [30] Wang J, Cai X, Wang ZG, et al. Isolation and identification of exosomes from human adipose-derived mesenchymal stem cells. *Chin J Tissue Eng Res*, 2019, 23(17):2651-2658. (in Chinese)
- 王静, 蔡霞, 王志国, 等. 分离与鉴定人脂肪间充质干细胞来源的外泌体. *中国组织工程研究*, 2019, 23(17):2651-2658.
- [31] Liga A, Vliegthart AD, Oosthuizen W, et al. Exosome isolation: a microfluidic road-map. *Lab Chip*, 2015, 15(11):2388-2394.
- [32] Yang F, Liao X, Tian Y, et al. Exosome separation using microfluidic systems: size-based, immunoaffinity-based and dynamic methodologies. *Biotechnol J*, 2017, 12(4):1600699.
- [33] Vizoso FJ, Eiro N, Cid S, et al. Mesenchymal stem cell secretome: toward cell-therapeutic strategies in regenerative medicine. *Int J Mol Sci*, 2017, 18(9):E1852.
- [34] Miceli V, Pampaloni M, Vella S, et al. Comparison of immunosuppressive and angiogenic properties of human amnion-derived mesenchymal stem cells between 2D and 3D culture systems. *Stem Cells Int*, 2019, 2019:7486279.
- [35] Cheng L, Zhang K, Wu S, et al. Focus on mesenchymal stem cell-derived exosomes: opportunities and challenges in cell-free therapy. *Stem Cells Int*, 2017, 2017:6305295.
- [36] Patel DB, Santoro M, Born LJ, et al. Towards rationally designed biomanufacturing of therapeutic extracellular vesicles: impact of the bioproduction microenvironment. *Biotechnol Adv*, 2018, 36(8):2051-2059.
- [37] Vitha AE, Kollefthart AW, Huang CC, et al. Characterization and therapeutic uses of exosomes: a new potential tool in orthopedics. *Stem Cells and Dev*, 2018, 28(2):141-150.
- [38] Moon GJ, Sung JH, Kim DH, et al. Application of mesenchymal stem cell-derived extracellular vesicles for stroke: biodistribution and microRNA study. *Transl Stroke Res*, 2018. [Epub ahead of print]