

间充质干细胞外泌体移植治疗缺血性心脏病

刘东月^{1, 2, 3}, 王宪云^{2, 3, 4}, 王乐^{1, 2, 3}, 郑明奇^{1, 2, 3}, 尹亚娟^{1, 2, 3}, 杨佳炜^{1, 2, 3}, 丁理妮^{1, 2, 3}, 刘刚^{1, 2, 3}<https://doi.org/10.12307/2023.612>

投稿日期: 2022-05-10

采用日期: 2022-08-05

修回日期: 2022-08-18

在线日期: 2022-09-13

中图分类号:

R453; R363; R364

文章编号:

2095-4344(2023)15-02435-08

文献标识码: A

文章快速阅读: 间充质干细胞外泌体移植治疗缺血性心脏病的主要机制

间充质干细胞外泌体

01

外泌体的基本特征

外泌体基本特征, 分离方法比较, 包括超速离心法、超滤法、免疫亲和捕获法、基于微流体的分离技术和化学沉淀法

02

外泌体移植治疗缺血性心脏病的主要机制

促血管形成作用、心肌细胞保护作用、抗心肌纤维化、调节免疫反应

03

外泌体功能优化策略

基因工程修饰策略、miRNA 修饰策略、药物或物理条件预处理策略、提高外泌体产量

03

外泌体移植优化策略

生物材料运载外泌体、两步递送法、外泌体喷雾技术、细胞膜修饰

文题释义:

外泌体: 是细胞外囊泡的一种, 粒径大小为30~150 nm, 由细胞内的多囊泡体与细胞膜融合后释放到细胞外基质中, 广泛存在于细胞培养上清以及各种体液中。

缺血性心脏病: 是指冠状动脉发生粥样硬化, 从而引起管腔狭窄或闭塞, 最终导致心肌缺血坏死而引起的心脏病。

摘要

背景: 缺血性心脏病是严重威胁人类生命健康的疾病类型之一, 而干细胞分泌的外泌体已经在缺血性心脏病的治疗中展示出良好的效果和应用前景, 并取得了重要研究进展。

目的: 就间充质干细胞外泌体移植治疗缺血性心脏病的疗效、作用机制、优化方案和移植策略分别予以阐述。

方法: 第一作者于2021年2月应用计算机在PubMed数据库检索1973年1月至2022年3月相关文献, 以“mesenchymal stem cell, exosomes, ischemic heart disease”为英文检索词, 最终纳入英文文献88篇文献进行分析。

结果与结论: ①干细胞分泌的外泌体为细胞外囊泡的重要组成部分, 是干细胞发挥功能调节的关键组分, 且已经在缺血性心脏病方面展示出良好的治疗效果和应用前景。②间充质干细胞分泌的外泌体可促进缺血损伤心肌组织的血管生成和心肌保护作用、抑制心脏纤维化和改善免疫调节等, 进而促进心肌修复和心功能改善。③通过基因工程修饰、miRNA修饰、药物或物理条件预处理以及提高外泌体产量等手段可对干细胞外泌体的产量或功能特性等进行优化, 以提高其对缺血性心脏病的治疗效果。④利用生物材料运载外泌体、两步递送法、外泌体喷雾技术或细胞膜修饰外泌体等外泌体移植优化策略, 可有效提高间充质干细胞外泌体在损伤心肌组织的滞留率, 从而增强其对缺血性心脏病的治疗效果。

关键词: 缺血性心脏病; 间充质干细胞; 外泌体; 血管生成; 纤维化; 修复机制; 优化策略; 移植策略

Mesenchymal stem cell-derived exosome transplantation for ischemic heart disease

Liu Dongyue^{1, 2, 3}, Wang Xianyun^{2, 3, 4}, Wang Le^{1, 2, 3}, Zheng Mingqi^{1, 2, 3}, Yin Yajuan^{1, 2, 3}, Yang Jiawei^{1, 2, 3}, Ding Lini^{1, 2, 3}, Liu Gang^{1, 2, 3}¹Department of Cardiovascular Medicine, First Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang 050031, Hebei Province, China; ²Hebei International Joint Research Center for Structural Heart Disease, Shijiazhuang 050031, Hebei Province, China; ³Hebei Provincial Key Laboratory of Heart and Metabolism, Shijiazhuang 050031, Hebei Province, China; ⁴Cell Therapy Laboratory, First Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang 050031, Hebei Province, China
Liu Dongyue, Master candidate, Department of Cardiovascular Medicine, First Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang 050031, Hebei Province, China; Hebei International Joint Research Center for Structural Heart Disease, Shijiazhuang 050031, Hebei Province, China; Hebei Provincial Key Laboratory of Heart and Metabolism, Shijiazhuang 050031, Hebei Province, China**Corresponding author:** Liu Gang, MD, Chief physician, Department of Cardiovascular Medicine, First Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang 050031, Hebei Province, China; Hebei International Joint Research Center for Structural Heart Disease, Shijiazhuang 050031, Hebei Province, China; Hebei Provincial Key Laboratory of Heart and Metabolism, Shijiazhuang 050031, Hebei Province, China河北医科大学第一医院, ¹心血管内科, ⁴细胞治疗实验室, 河北省石家庄市 050031; ²河北省结构性心脏病国际联合研究中心, 河北省石家庄市 050031; ³河北省心脏与代谢重点实验室, 河北省石家庄市 050031

第一作者: 刘东月, 女, 1994年生, 河北省邢台市人, 汉族, 河北医科大学在读硕士。

通讯作者: 刘刚, 博士, 主任医师, 河北医科大学第一医院心血管内科, 河北省石家庄市 050031; 河北省结构性心脏病国际联合研究中心, 河北省石家庄市 050031; 河北省心脏与代谢重点实验室, 河北省石家庄市 050031

<https://orcid.org/0000-0001-7275-4985> (刘东月); <https://orcid.org/0000-0003-1221-3698> (刘刚)

基金资助: 河北省科技支撑计划重点项目(203777117D), 项目负责人: 刘刚; 河北省外国引进智力项目(YZ202001), 项目负责人: 刘刚; 河北省自然科学基金项目(C2018206037), 项目负责人: 王宪云; 精准医学联合基金重点项目(H2021206399), 项目负责人: 郑明奇; 精准医学联合基金培育项目(H2021206031), 项目负责人: 王乐; 河北省引进留学人员资助项目(C20210347), 项目负责人: 王宪云

引用本文: 刘东月, 王宪云, 王乐, 郑明奇, 尹亚娟, 杨佳炜, 丁理妮, 刘刚. 间充质干细胞外泌体移植治疗缺血性心脏病[J]. 中国组织工程研究, 2023, 27(15):2435-2442.



Abstract

BACKGROUND: Ischemic heart disease is one type of disease that seriously threatens human life and health. Mesenchymal stem cells derived exosomes have shown obvious therapeutic effects and application prospects in ischemic heart disease, and make important research progress.

OBJECTIVE: To review the therapeutic effect of mesenchymal stem cells derived exosomes for ischemic heart disease, repair mechanisms, optimized plan and improved transplantation strategy.

METHODS: The relevant articles published from January 1973 to March 2022 were searched in PubMed by the first author in February 2021. The English key words were "mesenchymal stem cell, exosome, ischemic heart disease". Finally, 88 articles were included and analyzed.

RESULTS AND CONCLUSION: (1) Exosomes secreted by stem cells are one of the most important components of stem cell excretion to play functional regulation which have shown obvious therapeutic effects and application prospects in ischemic heart disease. (2) Mesenchymal stem cells derived exosomes can promote the angiogenesis and protect ischemia-injured myocardial tissue, inhibit cardiac fibrosis and improve immune regulation, finally promote myocardial repair and the improvement of cardiac function. (3) The production or functional properties of mesenchymal stem cells derived exosomes can be optimized by genetic engineering modification, miRNA modification, pretreated of drugs or physical intervention, and improve exosome production, so as to improve their therapeutic effect on ischemic heart disease. (4) Using biomaterials to carry exosomes, two-step delivery method, exosome spray technology or cell membrane modified exosomes and other exosome transplantation optimization strategies can effectively improve the retention rate of mesenchymal stem cell-derived exosomes in injured myocardial tissue, thereby enhancing their therapeutic effect on ischemic heart disease.

Key words: ischemic heart disease; mesenchymal stem cell; exosome; angiogenesis; fibrosis; repair mechanism; optimized plan; transplantation strategy

Funding: Science and Technology Support Program of Hebei Province, No. 203777117D (to LG); Foreign Intelligence Project of Hebei Province, No. YZ202001 (to LG); Natural Science Youth Fund Project of Hebei Province, No. C2018206037 (to WXY); Key Project of Precision Medicine Joint Fund, No. H2021206399 (to ZMQ); Precision Medicine Joint Fund Cultivation Project, No. H2021206031 (to WL); Introduced Overseas Students Funding Project of Hebei Province, No. C20210347 (to WXY)

How to cite this article: LIU DY, WANG XY, WANG L, ZHENG MQ, YIN YJ, YANG JW, DING LN, LIU G. Mesenchymal stem cell-derived exosome transplantation for ischemic heart disease. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu. 2023;27(15):2435-2442.

0 引言 Introduction

缺血性心脏病是指冠状动脉发生粥样硬化，从而引起管腔狭窄或闭塞，最终导致心肌缺血坏死而引起的心脏病，简称冠心病。目前，缺血性心脏病仍然是世界范围内主要死因 [1]，虽然临床上的经皮冠状动脉植入术和冠状动脉旁路移植术可迅速恢复心肌供血，但并不能阻止动脉粥样硬化的进展，且术后并发症还会加重心肌损伤 [2]。随着再生医学技术的不断发展，间充质干细胞在治疗缺血性心脏病方面发挥着重要作用，具有独特优势。间充质干细胞是指从人体组织中分离出来的、具有多向分化潜能和免疫调节特性的一类多能干细胞。许多研究已证明间充质干细胞治疗缺血性心脏病的可行性、安全性和有效性 [3-5]，但因受间充质干细胞种类、移植方法与剂量、移植后归巢率和存活率等问题的影响使其疗效仍未能充分发挥 [6]。据报道，间充质干细胞治疗缺血性心脏病的主要机制是通过旁分泌作用实现的，其分泌的外泌体是旁分泌组分中发挥功能修复的重要组成部分，已经逐渐受到广大研究者的关注。

外泌体是一种可由多种细胞分泌的细胞外囊泡，其携带的脂质、蛋白质、mRNAs 和 microRNAs 等成分在细胞间通讯、信号转导和免疫调节中发挥作用 [7-8]，且间充质干细胞外泌体已被证明可通过刺激血管生成、调节心肌细胞内钙离子平衡、抑制心肌细胞氧化应激反应等机制来改善心功能 [9-10]。此外，与间充质干细胞移植相比，间充质干细胞外泌体在促进心脏功能修复方面显示出独特优势，如恶性潜能较低、免疫调节作用更强、易于储存和移植、排斥反应较弱 [11]。更重要的是，外泌体移植受肺部截留效应影响较小 [12]。因此，利用间充质干细胞外泌体治疗缺血性心脏病已经在干细胞替代疗法中展现出良好的应用前景。

由于外泌体对缺血性心脏病强大的治疗效果，以及相较于干细胞而言的低免疫原性、低恶性潜能、易于储存和移植等优点，尤其是其低免疫原性，为外泌体在组织工程移植手术中提供了新思路，使得外泌体成为近年来无细胞组织工程的研究热点。因此，无细胞疗法已成为新的研究热点，外泌体作为无细胞治疗的主要研究方向之一，已经得到了广泛的关注。

该综述将对间充质干细胞外泌体的基本特征、修复疗效、作用机制、优化方案和移植策略分别予以阐述。

1 资料和方法 Data and methods

1.1 资料来源

1.1.1 检索人及检索时间 第一作者于 2022 年 4 月应用计算机进行检索。

1.1.2 检索文献时限 1973 年 1 月至 2022 年 3 月。

1.1.3 检索数据库 PubMed 数据库。

1.1.4 检索词 英文检索词：“mesenchymal stem cell, exosome, Ischemic heart disease, Transplantation strategy”。

1.1.5 检索文献类型 综述性论文、研究性论文及著作。

1.1.6 手工检索情况 无。

1.1.7 检索策略 PubMed 数据库检索策略，见图 1。

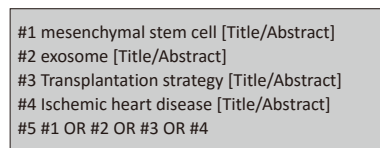


图 1 | PubMed 数据库检索策略图

1.1.8 检索文献量 初步共检索到文献 1 560 篇，均为英文文献。

1.2 入组标准

1.2.1 纳入标准 通过文章标题及摘要进行初步筛选，通过精读及泛读筛选出与研究相关的文献。

1.2.2 排除标准 研究目的及内容与此综述无关的文献和重复性研究。

1.3 文献质量评估及数据的提取 共检索到文献 1 560 篇，均为英文文献，排除与研究目的相关性差及内容陈旧、重复的文献。最后纳入 88 篇英文文献，见图 2。

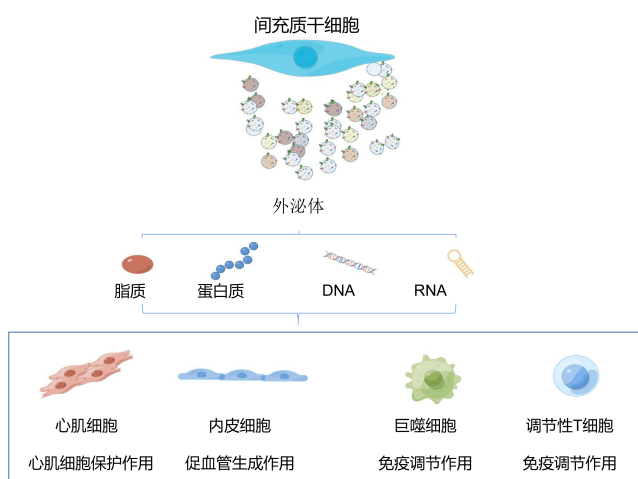


图 2 | 文献筛选流程图

2 结果 Results

2.1 外泌体

2.1.1 外泌体基本特征 外泌体是指从细胞中释放出来的大小为 30–150 nm 的细胞外囊泡, 主要通过细胞间通讯、抗原呈递及其携带因子的转移等途径发挥功能调节作用。干细胞外泌体的主要营养组分包括蛋白质、脂质、DNA 和 RNA, 见图 3。其中脂质包括白三烯、花生四烯酸、磷脂酸、前列腺素、溶血磷脂酰胆碱和二十二六烯酸; 蛋白质包括典型的膜蛋白如 GPI 锚定蛋白、受体蛋白如肿瘤坏死因子受体 1、抗原呈递蛋白和细胞黏附因子等^[13-15]; microRNA 包括 miRNA-21、miRNA-15a 和 miRNA-223 等^[15-16]。不同类型间充质干细胞在不同环境刺激下分泌的外泌体所含的生物组分比例不同, 表明间充质干细胞外泌体的修复潜力可通过优化间充质干细胞而得到更好的优化^[17]。此外, 间充质干细胞外泌体具有的低免疫原性、较高的稳定性和良好的生物相容性, 能够作为生物信息载体在缺血性心脏病的治疗中展现出更广泛的应用前景^[18]。



图注: 间充质干细胞外泌体主要包括蛋白质、脂质、RNA 以及 DNA, 且作用的主要靶细胞为心肌细胞、内皮细胞、巨噬细胞以及调节性 T 细胞^[13-15]

图 1 | 外泌体主要组分及其作用的部分靶细胞 (绘科研 id: TOPUI607B0)

2.1.2 干细胞外泌体提取方法 目前, 外泌体提取方法包括超滤法、超速离心法、免疫亲和捕获法、化学沉淀法和基于微流体的分离技术等, 超速离心法是最常用的外泌体分离方法, 该方法提取外泌体产量高, 但纯度较差^[19-22]。超滤法相较于超速离心法工作量小、耗时短及设备依赖性小^[23-24], 且高效液相层析法可提取高纯度外泌体, 但超滤法容易发生过滤膜堵塞和囊泡截留问题^[23]。免疫亲和捕获法、基于微流体的分离技术和化学沉淀法是基于外泌体特异性分离的方法, 其中免疫亲和捕获法显著优点是选择性分离特定细胞亚群外泌体且外泌体富集程度较高, 但样品预处理环节复杂^[23]。总之, 以上几种提取方法各有优缺点。

2.2 间充质干细胞源外泌体移植治疗缺血性心脏病的主要机制

2.2.1 促血管形成作用 心肌梗死后损伤区域的血管生成能力有限, 严重的血管生成障碍导致心肌缺氧从而加重心肌损伤, 因此, 促血管生成研究成为治疗缺血性心脏病的主要机制之一^[25]。研究表明, 间充质干细胞外泌体能够发挥与间充质干细胞类似的促血管生成作用, 但不同环境条件下间充质干细胞外泌体的作用机制不尽相同。据报道, 间充质干细胞外泌体被血管内皮细胞摄取后可通过释放细胞外基质金属蛋白酶诱导剂 (extracellular matrix metalloproteinase inducer, EMMPI) 激活内皮细胞中 Erk

和 Akt 途径刺激血管的发芽长度、发芽数量和细胞浸润能力等从而促进血管生成^[10]。EMMPI 又可作为血管内皮生长因子 2 (Vascular endothelial growth factor, VEGFR2) 的共受体, 通过 EMMPI-VEGFR2 途径刺激血管生成^[26]。此外, 间充质干细胞外泌体含有的半乳糖凝集素 1、ezrin 和 p195 是与内皮细胞增殖和血管生成相关的细胞黏附因子, 提示外泌体可通过自身携带的细胞因子促进血管生成^[9]。

微小核糖核酸 (miRNA) 是外泌体中另一重要的功能物质, 其种类众多且功能复杂, 但组分相对稳定, 已被证明参与间充质干细胞外泌体介导的促血管形成作用。据报道, 间充质干细胞外泌体中 miR-125a 可通过特异性结合 DLL4 (Angiogenic inhibitor delta-like 4, DLL4) 的 3'-UTR 促进血管生成, miR-125a 还可通过上调内皮细胞促血管生成因子 Ang1 和 Flk1、下调抗血管生成因子 Vash 和 TSP1 来促进血管生成^[27]。同时间充质干细胞外泌体中 miR-125a 诱导血管内皮细胞产生的纤维细胞生长因子 β (fibroblast growth factor- β , FGF- β) 和肝细胞生长因子也可显著促进血管生成^[28]。此外, 间充质干细胞外泌体中的 miR-291、miR-132、miR-17 和 miR-210 也具有促血管生成作用^[29-32]。由此可见, 间充质干细胞外泌体携带丰富的 miRNAs 组分, 在促血管形成方面发挥着非常重要的作用。

2.2.2 心肌细胞保护作用 心肌细胞耗氧量较大, 因此对缺氧耐受能力极差。当发生缺血缺氧时, 心肌细胞极易发生凋亡、氧化应激和自噬过度激活, 最终导致心脏功能降低。越来越多研究发现间充质干细胞外泌体在抗凋亡、抗氧化应激及调节自噬方面发挥重要作用, 下面就该 3 个方面进行详细阐述。

抗凋亡作用: 心肌细胞极易受心肌缺血或氧化应激的影响而发生凋亡或坏死, 如何有效抑制心肌细胞的凋亡将是间充质干细胞外泌体发挥心肌保护作用的重要方面。研究表明, 间充质干细胞外泌体中富含的 miRNAs 组分具有显著的抗凋亡和抗氧化作用。例如: miR-125b 可抑制心肌细胞中促凋亡基因 P53 和 BAK1 的表达而起到抗凋亡作用^[33]; miR-21 可通过下调心肌细胞中促凋亡蛋白 caspase3、细胞程序性死亡蛋白 4 (programmed cell death 4, PDCD4) 等发挥抗凋亡作用; miR-21 还可通过 PTEN/PI3K/Akt 途径抑制心肌细胞凋亡^[34-35]; miR-25-3p 通过调节心肌细胞中促凋亡基因 FASL 和 PTEN 的表达发挥抗凋亡作用^[36]; 间充质干细胞外泌体中的 miR-19 可下调心肌细胞中第 10 号染色体缺失的磷酸酶和张力蛋白同源物基因和 BIM 基因的表达、激活 Akt/ERK 通路来抑制心肌细胞凋亡^[37]。另一项研究表明, 间充质干细胞外泌体中 miR-210 可通过降低心肌细胞中凋亡诱导因子 3 (apoptosis-inducing factor, mitochondrion-associated 3, AIFM3) 和磷酸化蛋白激酶 B (phosphorylated Protein Kinase B, PKB) 的表达从而抑制心肌细胞凋亡^[38]。除此之外, 间充质干细胞外泌体中的 miR-23a-3p 可通过抑制心肌细胞中二价金属转运蛋白 1 (divalent metal transporter 1, DMT1) 的表达从而抑制心肌细胞死亡并减轻心肌缺血损伤^[39]。另外, 过表达 GATA 结合蛋白 4 (Recombinant GATA binding protein 4, GATA-4) 的间充质干细胞外泌体可减少心肌细胞凋亡且保护线粒体功能和线粒体膜电位^[40]。总之间充质干细胞外泌体在抗心肌细胞凋亡方面发挥巨大作用。

抗氧化应激作用: 影响心肌细胞存活的主要因素是缺血再灌注产生的氧化应激损伤, 它可引起脂质过氧化反应并降低细胞膜流动性, 从而影响细胞膜离子通道的功能, 造成细胞膜损伤^[41]。还可造成 DNA 损伤, 使 DNA 氢键断裂、碱基降解和主链解旋^[42]。氧化应激还会导致线粒体损伤, 造成线粒体肿胀、功能紊乱、数量减少甚或消失^[43]。此外, 氧化应激诱发的脂

质过氧化反应生成的氧化型低密度脂蛋白 (oxidized-Low density lipoprotein, ox-LDL) 容易被巨噬细胞识别并吞噬形成泡沫细胞, 形成粥样斑块诱发冠心病^[43]。研究表明, 间充质干细胞外泌体显示出较高的抗氧化应激能力, 如 miR-19a 可靶向抑癌基因 CYLD 的 3'UTR 抑制心肌细胞氧化应激, 还可通过降低细胞核中活性氧自由基来抑制心肌细胞氧化应激损伤^[44]。其他研究结果显示, 间充质干细胞外泌体还可通过激活心肌细胞中 PI3K/Akt 信号通路降低心肌细胞的氧化应激水平, 进而恢复小鼠心脏的能量供应^[44]。此外, 在缺血和缺氧期间, 间充质干细胞外泌体可通过降低心肌细胞活性氧自由基水平抑制心肌细胞损伤^[45]。另外, 间充质干细胞外泌体预处理可显著提高过氧化氢刺激 H9C2 细胞后的细胞活力和增殖能力^[46]。间充质干细胞外泌体中 miR-214 还可降低心肌细胞活性氧生成水平来抑制氧化应激^[40]。由此可见间充质干细胞外泌体可通过抑制心肌细胞氧化应激起到保护心脏的作用。

调节自噬: 自噬是一种细胞器和蛋白质的降解过程, 在维持细胞内外环境平衡中起重要作用。自噬在心血管病发病过程中具有双向作用, 生理情况下, 自噬可维持细胞代谢平衡, 病理情况下, 自噬被过度激活而导致细胞凋亡^[47]。因此抑制应激条件下自噬过度激活有利于心肌细胞存活。据报道, 间充质干细胞外泌体中多种 miRNAs 已被证明可显著抑制过度自噬诱导的心肌损伤作用^[48], 如间充质干细胞外泌体中 miR-34a 和 miR-101 可分别靶向心肌细胞中肿瘤坏死因子 α 和重组 DNA 损伤诱导转录因子 4(recombinant DNA damage inducible transcript 4, DDIT4) 抑制自噬, 从而减轻心肌缺氧/复氧损伤^[49-50]; 间充质干细胞外泌体中 miR-21 可通过激活 H9C2 细胞中 Akt/mTOR 通路抑制自噬活性以减少缺氧/复氧诱导的细胞凋亡^[51]; 间充质干细胞外泌体中 miR-206 和 miR-216b 可联合下调心肌细胞中的自噬基因 ATG13 表达从而抑制自噬活性^[52]; 间充质干细胞外泌体中 miR-103-3p 和 miR-638 均通过靶向抑制自噬囊泡形成的关键蛋白 ATG5 而抑制心肌细胞凋亡^[53-54]; 间充质干细胞外泌体中 miR-143-3p 可直接通过靶向 CHK2-Beclin2 通路抑制心肌细胞自噬, 有效减少心肌细胞凋亡^[55]。由此可见, 间充质干细胞外泌体通过抑制心肌细胞过度自噬保护心肌免受缺血缺氧损伤。

文章总结了干细胞外泌体对心肌细胞的保护作用及其机制的相关研究成果, 详见表 1。

表 1 | 干细胞外泌体对心肌细胞的保护作用及其机制

研究者	发表年份	对心肌的保护作用	MSC-Exos 作用机制
TIMMERS 等 ^[45]	2007	抗氧化应激	干细胞外泌体可降低心肌细胞中活性氧水平, 从而抑制心肌细胞氧化应激
HONG 等 ^[44]	2017	抗氧化应激	降低心肌细胞中活性氧自由基水平、靶向心肌细胞抑癌基因 CYLD 的 3'UTR, 从而抑制心肌细胞凋亡
ZHU 等 ^[33]	2018	抗凋亡	MSC-Exos 通过 miR-125b 抑制心肌细胞中促凋亡基因 P53 和 BAK1
SHI 等 ^[34]	2018	抗凋亡	MSC-Exos 中含有的 miR-21 可通过 PTEN/PI3K/Akt 途径抑制心肌细胞凋亡
ZHANG 等 ^[53]	2019	调节自噬	MSC-Exos 通过 miR-103-3p 和 miR-638 靶向自噬囊泡形成关键蛋白 ATG5, 从而抑制囊泡形成, 抑制心肌细胞自噬
PENG 等 ^[36]	2020	抗凋亡	MSC-Exos 通过 miR-25-3p 下调心肌细胞中的促凋亡基因 FASL 和 PTEN, 从而抑制心肌细胞凋亡
CHEN 等 ^[55]	2021	调节自噬	MSC-Exos 中 miR-143-3P 直接靶向 CHK2-Beclin2 通路, 从而抑制心肌细胞自噬

表注: MSC-Exos 为间充质干细胞外泌体。CYLD 为一种肿瘤抑制因子。P53 为一种抑癌基因, 可促使细胞凋亡。BAK1 为 Bcl2 拮抗/杀伤因子 1。PTEN/PI3K/Akt 途径为 PTEN 可抑制 PI3K/Akt 通路, 从而促进细胞凋亡。ATG5 为一种自噬相关蛋白。FASL 为凋亡相关因子配体。PTEN 为蛋白酪氨酸磷酸酶基因。CHK2-Beclin2 为细胞周期检验点激酶 2 调控自噬相关蛋白 Beclin2

2.2.3 抗心肌纤维化 心肌梗死导致缺血性心肌细胞死亡会引起心脏多项修复反应, 其中心肌纤维化是修复反应中重要过程, 虽然最初纤维化过程对防止心室壁破裂至关重要, 但过度纤维化会导致心脏功能进行性损害, 并最终导致心力衰竭^[56]。因此, 抗心肌组织过度纤维化是改善心力衰竭的一个研究方向。

研究表明, 间充质干细胞外泌体已被证明可减少心肌梗死模型中的梗死面积、纤维化面积和心肌细胞凋亡数量^[57]。间充质干细胞外泌体预处理正常大鼠可改善预处理大鼠心梗后心脏炎症水平、纤维化水平和心脏功能。这种作用机制是间充质干细胞外泌体通过抑制转化生长因子 β 介导的成纤维细胞向肌成纤维细胞转化, 从而抑制心肌纤维化^[11]。此外间充质干细胞外泌体携带的 miRNA 可发挥重要抗纤维化作用。如缺血预处理的间充质干细胞外泌体可通过 miR-22 靶向成纤维细胞中甲基化 CpG 结合蛋白 2(methyl-CpG-binding protein 2, MECP2) 来改善心肌梗死导致的心脏纤维化, 从而有效改善心功能^[58]。另一项研究表明, 间充质干细胞外泌体可通过 miR-671 抑制转化生长因子 β 信号传导从而抑制心肌梗死引起的心肌纤维化^[59-60]。

2.2.4 调节免疫反应 间充质干细胞外泌体可通过免疫调节改善缺血性心肌病的治疗效果。研究表明, 间充质干细胞外泌体可通过调节性 T 细胞 (Treg 细胞) 抑制免疫反应^[61]。间充质干细胞外泌体中 miR-181a 可通过 c-fos(c-fos 是一种关键的免疫激活剂) 途径减少 ox-LDL 诱导的树突状细胞激活、炎症反应和 Treg 细胞活化, miR-181a 还可在蛋白和 DNA 水平上调 Treg 细胞中 FoxP3 的表达, FoxP3 可与 T 细胞核因子结合刺激 Treg 细胞活化以提高 Treg 细胞比例, 从而抑制免疫反应^[61]。另外, miR-181a 可整合到心肌细胞 siRNA 中, 整合了 miR-181a 的 siRNA 与 c-fos 结合形成 c-fos-siRNA 复合物, 从而下调促炎因子肿瘤坏死因子 α 和白细胞介素 6、上调抗炎因子白细胞介素 10 和 Treg 细胞的比例^[61]。此外, miR-181a 还可通过靶向抑制 Smad7 阻止 Treg 细胞中转化生长因子 β 信号从而促进 Treg 细胞的极化, 以达到调控缺血性心脏病免疫修复的效果^[61]。此外, 间充质干细胞外泌体还可通过调节巨噬细胞极化来发挥抗炎作用。研究表明, 间充质干细胞外泌体在体内外均可通过 miR-182 抑制巨噬细胞 Toll 样受体活性从而激活 PI3K/Akt 信号通路, 进而起到减少 M1 型促炎巨噬细胞并增加 M2 型抗炎巨噬细胞数量的目的^[62]。miR-182 也可通过 TLR4/Akt 途径促进 M2 型巨噬细胞的极化^[62]。此外, 炎症因子 γ 干扰素 (interferon- γ , IFN- γ) 预处理间充质干细胞外泌体可促使 M2 型巨噬细胞极化^[63]。间充质干细胞外泌体中的一些细胞因子和生长因子如转化生长因子 β 、白细胞介素 6、白细胞介素 10 和肝细胞生长因子均有助于 M2 巨噬细胞极化^[64-65]。由此可见, 间充质干细胞外泌体的免疫调节作用, 可分别通过调节 T 细胞和巨噬细胞的极化调控免疫反应, 进而起到调控心肌修复的作用, 详见表 2。

表 2 | 干细胞外泌体对心肌细胞的免疫调节作用及其机制

研究者	发表年份	MSC-Exos 调节免疫反应作用机制
BURRELLO 等 ^[64]	2016	MSC-Exos 自身分泌的一些细胞因子如转化生长因子 β 、白细胞介素 6 和 HGF 均有助于 M2 巨噬细胞极化。从而抑制损伤心肌的免疫反应。
WEI 等 ^[61]	2019	MSC-Exos 中 miR-181a 可上调 Treg 细胞中 Foxp3 水平, Foxp3 与 T 细胞核因子结合从而使 Treg 细胞活化, 最终抑制免疫反应
ZHAO 等 ^[62]	2019	MSC-Exos 中 miR-182 抑制巨噬细胞 Toll 样受体活性以激活 PI3K/Akt 通路, 从而上调 M2 型巨噬细胞比例。

表注: 为 MSC-Exos 为间充质干细胞外泌体。HGF 为肝细胞生长因子。Treg 细胞为调节性 T 细胞。Foxp3 为叉头蛋白 P3, 调节性 T 细胞谱系的转录因子。PI3K/Akt 通路为磷脂酰肌醇 3 激酶 / 蛋白激酶 B 通路

2.3 间充质干细胞外泌体的功能优化策略 间充质干细胞外泌体已被证明较间充质干细胞具有更好的修复和调控作用。为了进一步提高外泌体的产量、稳定性和高效靶向修复特性，越来越多的研究聚焦于一些基因或工程化的修饰策略，下面就这些优化策略分别予以阐述。

2.3.1 基因工程修饰策略 目前，利用基因工程修饰技术提高外泌体功能的研究越来越多，比如过表达 4 型趋化因子受体 (CXCR4) 的间充质干细胞外泌体在减轻左心室重塑和促进心功能恢复方面表现出良好性能^[66]，过表达 GATA-4 的间充质干细胞外泌体可显著增加心肌细胞耐缺氧能力，以促进损伤心肌的修复^[37]。为进一步有效提高间充质干细胞外泌体的心脏归巢能力，心脏归巢肽 (IMTP) 修饰的间充质干细胞外泌体向缺血心肌组织的靶向归巢能力更强，并有效减少心肌梗死区炎症、细胞凋亡和心肌纤维化反应等^[67]。金属蛋白酶组织抑制剂 2 (Tissue inhibitors of metalloproteinase-2, TIMP-2) 是基质金属蛋白酶抑制剂家族成员，它可抑制基质金属蛋白酶引起的心肌梗死后的心肌重构。

研究表明，过表达 TIMP2 的脐带间充质干细胞外泌体可显著抑制 H₂O₂ 介导的 H9C2 细胞凋亡，促进内皮细胞增殖、迁移和管形成，并通过减少成纤维细胞中转化生长因子 β 诱导的基质金属蛋白酶 2、基质金属蛋白酶 9 和 α 平滑肌蛋白抑制心肌纤维化过程，同时还可上调心肌细胞中谷胱甘肽和超氧化物歧化酶的表达，降低丙二醛的水平，从而抑制心肌细胞中氧化应激反应^[68]。由此可见，经特定基因修饰的间充质干细胞外泌体具备某些与该基因相关的特定功能，能够为缺血性心脏病的治疗提供更多的治疗方法。

2.3.2 miRNA 修饰策略 研究表明，过表达特定 miRNA 可增强间充质干细胞外泌体对损伤心肌修复作用。如过表达 miR-181a 的间充质干细胞外泌体可通过 miRNA-181a 靶向调控 c-Fos 基因表达、减弱 ox-LDL 诱导的树突状细胞的激活、下调心肌细胞中肿瘤坏死因子 α 和白细胞介素 6、上调抗炎因子白细胞介素 10 和 Treg 细胞的比例，进而发挥抗炎调节作用^[61]。此外，过表达 miR-133 的骨髓间充质干细胞外泌体还可下调人外周血单核细胞中促炎细胞因子肿瘤坏死因子 α 和白细胞介素 6 以及上调抗炎细胞因子白细胞介素 10 的表达^[69]。过表达 miR-133 的间充质干细胞外泌体还能诱导 Treg 细胞的形成，显著改善心脏炎症水平、减小梗死面积并抑制心肌纤维化^[69]。过表达 miR-146 的脂肪间充质干细胞外泌体可通过抑制生长因子 1 的表达并减弱 Toll 样受体核转录因子 κB 信号传导来抑制心肌梗死大鼠心肌炎症反应和心肌纤维化^[70]。总之，通过过表达特定 miRNA 可提高间充质干细胞外泌体对缺血性心脏病的治疗效果。

2.3.3 药物或物理条件预处理策略 许多研究表明，用药物或条件预处理干细胞可显著增强干细胞及其外泌体的心脏修复功能。如阿托伐他汀可通过上调间充质干细胞外泌体中的 lncRNA H19 促进内皮细胞迁移、管状结构形成和存活率，最终减少心肌细胞凋亡、缩小梗死面积并显著改善心功能^[71]。H₂O₂ 处理间充质干细胞可通过提高其外泌体中 miR-21 含量抑制氧化应激诱导的心肌细胞损伤，保护心脏功能^[34]。缺氧预处理间充质干细胞提高了其外泌体中 miR-125b-5p 含量从而抑制心肌细胞凋亡^[72]。脂多糖预处理骨髓间充质干细胞可增强其产生的外泌体对心肌的免疫调节作用，限制巨噬细胞中促炎因子的产生并减轻心肌炎症，还可通过抗心肌细胞凋亡改善间充质干细胞外泌体移植后 3 个月梗死心脏的心功能^[73]。由此可见，药物或条件预处理间充质干细胞方法简便，并可在一定程度上显著提高间充质干细胞外泌体在损伤心肌中的修复功能，具备很好的应用前景。

2.3.4 提高外泌体产量 外泌体产量低是限制外泌体临床转化的

一个重要因素，因此有相关研究致力于提高外泌体产量。如表面材料可提高外泌体释放效率，有研究者发明的一种表面材料可通过网格蛋白介导的内吞作用被转运到间充质干细胞溶酶体中，从而刺激间充质干细胞自噬相关因子表达来促进间充质干细胞外泌体分泌，增加外泌体产量^[74]。N-甲基多巴胺和去甲肾上腺素预处理间充质干细胞可促进其外泌体分泌，使外泌体产量提高 3 倍^[75]。缺氧预处理间充质干细胞亦可促进其外泌体分泌^[72]。因此条件预处理可提高间充质干细胞外泌体释放，从而在一定程度上解决了外泌体产量低的问题。

文章总结了间充质干细胞外泌体功能优化策略，详见表 3。

表 3 | 间充质干细胞外泌体功能优化策略

研究者	发表年份	优化策略	作用机制及疗效
STEPHANOPOULOS 等 ^[75]	2013	提高外泌体产量	N-甲基多巴胺和去甲肾上腺素处理干细胞，可使外泌体产量提高 3 倍
YU 等 ^[37]	2015	基因工程修饰	基因修饰过表达 GATA-4，可显著提高干细胞外泌体处理的心肌细胞的耐缺氧能力
KANG 等 ^[66]	2015	基因工程修饰	使干细胞外泌体过表达 CXCR-4，从而提高心脏归巢率
CHEN 等 ^[69]	2017	miRNA 修饰	miR-133 修饰的外泌体可下调单核细胞中肿瘤坏死因子 α
SHI 等 ^[34]	2018	药物物理条件预处理	过氧化氢预处理可上调干细胞外泌体中 miR-21，从而抑制心肌细胞氧化应激反应
NI 等 ^[68]	2019	基因工程修饰	TIMP-2 修饰的干细胞外泌体可显著抑制心肌细胞凋亡，促进血管生成
WEI 等 ^[61]	2019	miRNA 修饰	miR-181a 修饰的外泌体可发挥显著抗炎作用
XU 等 ^[73]	2019	药物物理条件预处理	脂多糖预处理可增强干细胞外泌体对心肌的免疫调节作用，并抑制炎症反应
HUANG 等 ^[71]	2020	药物物理条件预处理	阿托伐他汀预处理可上调干细胞外泌体中 lncRNAH19
PARK 等 ^[74]	2020	提高外泌体产量	表面材料内吞到干细胞中，可激活干细胞自噬相关因子，从而促进外泌体释放

表注：GATA-4 为一种锌指蛋白转录因子，参与心脏发育。CXCR-4 为趋化因子 4 受体。TIMP-2 为金属蛋白酶组织抑制因子 2。lncRNAH19 为一种长链非编码 RNA

2.4 干细胞外泌体移植优化策略 干细胞外泌体移植优化可提高其对心脏的靶向性，并增强其对缺血性心脏病的治疗疗效，下面就以下几个方面分别进行阐述，见图 4。

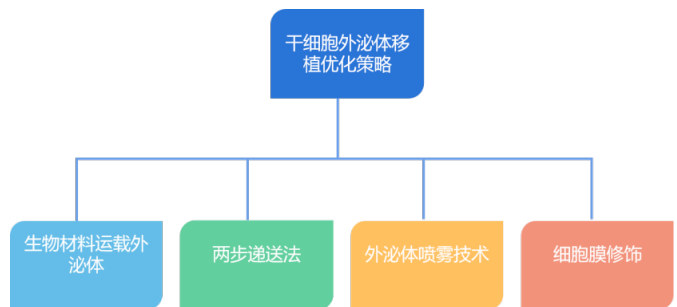


图 4 | 干细胞外泌体的移植优化策略图

2.4.1 生物材料运载外泌体 间充质干细胞外泌体对损伤心肌的修复能力已被证实，但其低靶向性限制了其治疗疗效。因此一些研究人员设计出以生物材料为载体运载外泌体的治疗方案，且在实验中取得了较好结果。有研究表明水凝胶含水量大、类似细胞外基质，具有很好的生物相容性和良好延展性，且可通过改变水凝胶物理性质控制外泌体释放速率，并且还可维持外泌体完整性^[76]。因此一些研究人员基于此设计出了一种剪切稀化凝胶 (Shear-thinning gel, STG)，这种凝胶可随剪切应力变化而改变自身物理状态，当剪切稀化凝胶包裹的外泌体 (SGT-EVs)

被注射入体时,随着剪切应力的增加,SGT-EVs变为液体状态,从而更易进入心肌组织,随着剪切应力的减小,SGT-EVs从液体状态变为凝胶状态,再通过扩散途径缓慢释放外泌体。研究表明,SGT-EVs可在21 d内稳定持续释放外泌体,并且减少了心肌纤维化、细胞凋亡和心肌炎症,还可改善血流动力学,如增加左室射血分数和心输出量,并增加梗死周围区的血管密度^[77]。另一团队设计了一种以 Fe_3O_4 为核,以二氧化硅为壳的纳米颗粒,该纳米颗粒具有识别外泌体特异性标志物CD63和受损心肌细胞肌球蛋白轻链的能力,该纳米颗粒可通过CD63特异性结合间充质干细胞外泌体,并通过识别受损心肌细胞肌球蛋白轻链而被募集到受伤心肌组织并释放外泌体,从而提高外泌体对受损心肌的靶向性,最终发挥抗心肌细胞凋亡、改善左心室功能作用^[78]。另一项研究开发了一个新型纳米颗粒,研究者将肽NapFF和肽PA-GHRPS混合形成PGN水凝胶,用于装载外泌体。PA-GHRPS肽可保护H9C2细胞免受 H_2O_2 诱导的氧化应激,肽NapFF可增强PA-GHRPS的胶质化能力。该研究数据表明,PGN水凝胶能够有效地包裹外泌体,并确保外泌体稳定和持续释放。与单独外泌体治疗相比,PGN水凝胶包裹外泌体组的心肌细胞中肿瘤坏死因子 α 水平显著降低,促纤维化基因转化生长因子 $\beta 1$ 表达水平也显著降低,结果表明该混合物可通过更强大的抗炎、抗纤维化、抗心肌凋亡以及促进血管生成能力来改善心肌功能^[46]。因此生物材料可提高间充质干细胞外泌体对损伤心肌的靶向修复能力。

2.4.2 两步递送法 外泌体疗法的低滞留率和巨噬细胞对外泌体的吞噬作用明显降低了其疗效,由此研究人员发明了两步递送法,又称“吃我/不吃我”策略。由于阳离子化甘露聚糖修饰的细胞外囊泡可提高被巨噬细胞吞噬的概率^[79],且有研究发现来源于CD2.4细胞的胞外小泡主要被巨噬细胞吞噬^[79],因此阳离子化甘露聚糖修饰CD2.4细胞的胞外小泡可显著提高被巨噬细胞吞噬的概率,从而使单核-巨噬系统饱和。CD47可与信号调节蛋白结合从而阻断单核-巨噬系统的吞噬过程。所以将富含CD47的外泌体与纳米颗粒融合可阻止被巨噬细胞吞噬^[80]。因此先注射阳离子化甘露聚糖修饰的CD2.4细胞的胞外小泡使单核-巨噬达到饱和,再注射与纳米颗粒融合的富含CD47的外泌体从而降低外泌体被巨噬细胞清除的概率,从而提高了外泌体疗法的治疗功效^[80]。由此可见,两步递送法可在一定程度上提高外泌体在心脏组织的滞留率。

2.4.3 外泌体喷雾技术 近年来,再生医学在心肌梗死治疗方面的研究有了一定进展,间充质干细胞外泌体已被确定为心肌梗死治疗的重要方法^[9-10, 81],然而,该疗法受到心脏输送效率低下的阻碍。因此该研究设计了一种基于生物材料和间充质干细胞外泌体相结合的微创外泌体喷雾技术。在心肌梗死小鼠模型中,外泌体喷雾可直接喷射到心肌表面,研究结果表明微创外泌体喷雾技术增加了心脏部位外泌体滞留率、减少了心肌纤维化、改善了心功能并促进了梗死后血管生成。该研究进一步测试了微创外泌体喷雾技术的安全性和可行性,结果表明,微创外泌体喷雾技术是一种具有可行性和安全性的混合物。因此该技术是一项具有前途的策略,可为冠心病治疗拓宽思路^[82]。

2.4.4 细胞膜修饰改善外泌体靶向修复特性 为进一步提高外泌体的心肌靶向特性,细胞膜修饰技术的发展为外泌体疗法的优化提高新的思路。研究表明,单核细胞膜修饰外泌体可形成单核细胞膜-外泌体复合物,单核细胞膜-外泌体复合物显著提高了其向缺血心肌的靶向归巢率性和滞留率、降低了心肌细胞中的炎症因子肿瘤坏死因子 α 和白细胞介素 1β 的含量、增加了M2型巨噬细胞的极化,从而起到免疫抑制作用。同时单核细胞

膜-外泌体复合物还具有促进内皮细胞成管能力和抑制心肌细胞凋亡的作用^[83]。此外,利用血小板膜修饰间充质干细胞外泌体提供了“不吃我”的信号蛋白CD47,进而阻止巨噬细胞摄取间充质干细胞外泌体,提高了其到达损伤心肌的靶向归巢率,有效促进心脏血管生成并抑制心肌氧化应激,进而提高了其对心肌梗死的修复作用^[84-86]。由此可见,不同的细胞膜具有不同的生物学特性,利用其修饰的间充质干细胞外泌体具备细胞膜和外泌体的双重特性,可为间充质干细胞外泌体的功能优化提高非常重要的策略。

3 讨论 Discussion

3.1 既往他人该领域研究的贡献和存在的问题 外泌体可被多种干细胞分泌,并且有广泛的调节作用。研究人员通过液相色谱-质谱联合检测骨髓间充质干细胞外泌体,发现骨髓间充质干细胞外泌体中含有许多蛋白质^[65],且这些蛋白质的功能提示骨髓间充质干细胞外泌体可能在缺血性心脏病中影响诸多过程,如血管生成和炎症相关过程^[87]。此外间充质干细胞外泌体中还检测到大量的miRNA,并且一部分miRNA已被证实对缺血性心脏病有调节作用。因此,间充质干细胞外泌体在缺血性心脏病中发挥着多种作用,除了目前已知的促进血管生成、抗心肌纤维化及调节氧化应激作用,还可通过调控心肌细胞的自噬过程和钙平衡来改善缺血性心脏病的心脏收缩功能。然而,由于外泌体的大规模提取技术限制,使得外泌体产量和纯度低的问题仍有待解决,且还需考虑外泌体样品中的杂质对心脏产生的未知或不良影响^[88]。因此,外泌体的产量和纯度问题仍有待进一步解决。该综述中还对外泌体的功能优化及移植改进策略进行了详细讨论,期望为有效提升外泌体移植治疗缺血性心脏病的疗法提供重要参考价值。

3.2 该综述区别于他人他篇的特点 目前,已报道的大部分关于间充质干细胞外泌体移植治疗缺血性心脏病的综述主要侧重于其作用机制的讨论,而对间充质干细胞外泌体的功能修饰和移植优化策略的综述较少。因此,该综述在详细介绍间充质干细胞外泌体对缺血性心脏病修复机制的同时,还对间充质干细胞外泌体的功能优化和移植优化策略进行了详细综述,例如间充质干细胞外泌体与生物材料相结合可提高心脏归巢率^[77],两步递送法减少了单核-巨噬系统对间充质干细胞外泌体的摄取^[80],外泌体喷雾技术可将间充质干细胞外泌体直接喷射到心肌表面,增加了间充质干细胞外泌体的滞留率^[82],细胞膜修饰技术可通过膜表面蛋白逃避巨噬细胞吞噬从而明显提高到达心肌的间充质干细胞外泌体剂量^[84-86]。此外文章还对基因工程修饰、miRNA修饰、药物或条件预处理以及间充质干细胞外泌体与表面材料结合增加外泌体产量等方式优化间充质干细胞外泌体功能进行了阐述。

3.3 综述的局限性 该综述存在一定局限性,由于文献筛选存在个人因素偏差,可能存在一些偏倚及误差,同时该综述还存在临床研究文献较少以及时间滞后性问题,但仍然能够为间充质干细胞外泌体在缺血性心脏病方面的治疗提供方法策略。

3.4 综述的意义 该综述是在一定时期内对干细胞与心脏病方向所发表的高质量文献中提取自己认为有价值的信息,并对信息进行归纳总结。研究者能够通过该综述在较短的时间内基本了解该领域研究进展,为研究者节约大量时间,同时为研究者后续在该领域的研究提供理论依据。

3.5 课题专家组对未来的建议 下一步研究者们可以改善干细胞外泌体提取方法、再生医学和基因工程与外泌体相结合提高干细胞外泌体功能和靶向性,再加以基础实验和临床反复验证,可为缺血性心脏病的治疗提供新的方法策略。

作者贡献: 文章设计者与文章撰写者为刘东月。资料收集者为王尧云、尹亚娟、杨佳伟和丁理妮。结果分析者为王乐和郑明奇。通讯作者刘刚审校。

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。

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。

版权转让: 文章出版前全体作者与编辑部签署了文章版权转让协议。

出版规范: 文章撰写遵守了《系统综述和荟萃分析报告规范》(PRISMA 声明); 出版前经过专业反剽窃文献检测系统进行 3 次文字和图表查重; 经小同行外审专家双盲审稿, 同行评议认为符合期刊发稿宗旨。

4 参考文献 References

- ADAMS RH, ALITALO K. Molecular regulation of angiogenesis and lymphangiogenesis. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2007;8(6):464-478.
- ARSLAN F, LAI RC, SMEETS MB, et al. Mesenchymal stem cell-derived exosomes increase ATP levels, decrease oxidative stress and activate PI3K/Akt pathway to enhance myocardial viability and prevent adverse remodeling after myocardial ischemia/reperfusion injury. *Stem Cell Res.* 2013;10(3):301-312.
- NOORT WA, OERLEMANS MI, ROZEMULLER H, et al. Human versus porcine mesenchymal stromal cells: phenotype, differentiation potential, immunomodulation and cardiac improvement after transplantation. *J Cell Mol Med.* 2012;16(8):1827-1839.
- VAN DER SPOEL TI, JANSEN OLS, AGOSTONI P, et al. Human relevance of pre-clinical studies in stem cell therapy: systematic review and meta-analysis of large animal models of ischaemic heart disease. *Cardiovasc Res.* 2011;91(4):649-658.
- JEEVANANTHAM V, BUTLER M, SAAD A, et al. Adult bone marrow cell therapy improves survival and induces long-term improvement in cardiac parameters: a systematic review and meta-analysis. *Circulation.* 2012;126(5):551-568.
- WANG X, ZHANG J, ZHANG F, et al. The clinical status of stem cell therapy for ischemic cardiomyopathy. *Stem Cells Int.* 2015;2015:135023.
- 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.
- LAI RC, YEO RW, TAN KH, et al. Exosomes for drug delivery—a novel application for the mesenchymal stem cell. *Biotechnol Adv.* 2013;31(5):543-551.
- LIANG X, ZHANG L, WANG S, et al. Exosomes secreted by mesenchymal stem cells promote endothelial cell angiogenesis by transferring miR-125a. *J Cell Sci.* 2016;129(11):2182-2189.
- VRIJSEN KR, MARING JA, CHAMULEAU SA, et al. Exosomes from cardiomyocyte progenitor cells and mesenchymal stem cells stimulate angiogenesis via EMMPRIN. *Adv Healthc Mater.* 2016;5(19):2555-2565.
- SHAO L, ZHANG Y, LAN B, et al. MiRNA-sequence indicates that mesenchymal stem cells and exosomes have similar mechanism to enhance cardiac repair. *Biomed Res Int.* 2017;2017:4150705.
- FISCHER UM, HARTING MT, JIMENEZ F, et al. Pulmonary passage is a major obstacle for intravenous stem cell delivery: the pulmonary first-pass effect. *Stem Cells Dev.* 2009;18(5):683-692.
- FITZNER D, SCHNAARS M, VAN ROSSUM D, et al. Selective transfer of exosomes from oligodendrocytes to microglia by macropinocytosis. *J Cell Sci.* 2011;124(Pt 3):447-458.
- VAN DER POLE E, BOING AN, GOOL EL, et al. Recent developments in the nomenclature, presence, isolation, detection and clinical impact of extracellular vesicles. *J Thromb Haemost.* 2016;14(1):48-56.
- 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.
- POWELL S, MCDUGALL C. Clinical recognition of leprosy: some factors leading to delays in diagnosis. *Br Med J.* 1974;1(5908):612-613.
- SLUIJTER JP, VERHAGE V, DEDDENS JC, et al. Microvesicles and exosomes for intracardiac communication. *Cardiovasc Res.* 2014;102(2):302-311.
- WANG X, TANG Y, LIU Z, et al. The application potential and advance of mesenchymal stem cell-derived exosomes in myocardial infarction. *Stem Cells Int.* 2021;2021:5579904.
- PACHLER K, LENER T, STREIF D, et al. A Good Manufacturing Practice-grade standard protocol for exclusively human mesenchymal stromal cell-derived extracellular vesicles. *Cytotherapy.* 2017;19(4):458-472.
- ANDRIOLO G, PROVASI E, LO CV, et al. Exosomes from human cardiac progenitor cells for therapeutic applications: development of a GMP-grade manufacturing method. *Front Physiol.* 2018;9:1169.
- ESCUDIER B, DORVAL T, CHAPUT N, et al. Vaccination of metastatic melanoma patients with autologous dendritic cell (DC) derived-exosomes: results of the first phase I clinical trial. *J Transl Med.* 2005;3(1):10.
- LAMPARSKI HG, METHA-DAMANI A, YAO JY, et al. Production and characterization of clinical grade exosomes derived from dendritic cells. *J Immunol Methods.* 2002;270(2):211-226.
- ZERINGER E, BARTA T, LI M, et al. Strategies for isolation of exosomes. *Cold Spring Harb Protoc.* 2015;2015(4):319-323.
- BATRAKOVA EV, KIM MS. Using exosomes, naturally-equipped nanocarriers, for drug delivery. *J Control Release.* 2015;219:396-405.
- SASAKI H, RAY PS, ZHU L, et al. Hypoxia/reoxygenation promotes myocardial angiogenesis via an NF kappa B-dependent mechanism in a rat model of chronic myocardial infarction. *J Mol Cell Cardiol.* 2001;33(2):283-294.
- KHAYATI F, PEREZ-CANO L, MAOUCHE K, et al. EMMPRIN/CD147 is a novel coreceptor of VEGFR-2 mediating its activation by VEGF. *Oncotarget.* 2015;6(12):9766-9780.
- LIANG X, ZHANG L, WANG S, et al. Exosomes secreted by mesenchymal stem cells promote endothelial cell angiogenesis by transferring miR-125a. *J Cell Sci.* 2016;129(11):2182-2189.
- XU H, WANG Z, LIU L, et al. Exosomes derived from adipose tissue, bone marrow, and umbilical cord blood for cardioprotection after myocardial infarction. *J Cell Biochem.* 2020;121(3):2089-2102.
- KHAN M, NICKOLOFF E, ABRAMOVA T, et al. Embryonic stem cell-derived exosomes promote endogenous repair mechanisms and enhance cardiac function following myocardial infarction. *Circ Res.* 2015;117(1):52-64.
- BARILE L, LIONETTI V, CERVIO E, et al. Extracellular vesicles from human cardiac progenitor cells inhibit cardiomyocyte apoptosis and improve cardiac function after myocardial infarction. *Cardiovasc Res.* 2014;103(4):530-541.
- GRAY WD, FRENCH KM, 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(2):255-263.
- KIM H S, CHOI D Y, YUN S J, et al. Proteomic analysis of microvesicles derived from human mesenchymal stem cells. *J Proteome Res.* 2012;11(2):839-849.
- ZHU LP, TIAN T, WANG J Y, et al. Hypoxia-elicited mesenchymal stem cell-derived exosomes facilitates cardiac repair through miR-125b-mediated prevention of cell death in myocardial infarction. *Theranostics.* 2018;8(22):6163-6177.
- SHI B, WANG Y, ZHAO R, et al. Bone marrow mesenchymal stem cell-derived exosomal miR-21 protects C-kit+ cardiac stem cells from oxidative injury through the PTEN/PI3K/Akt axis. *PLoS One.* 2018;13(2):e191616.
- CHEN CH, HSU SY, CHIU CC, et al. MicroRNA-21 mediates the protective effect of cardiomyocyte-derived conditioned medium on ameliorating myocardial infarction in rats. *Cells.* 2019. doi: 10.3390/cells8080935.
- PENG Y, ZHAO JL, PENG ZY, et al. Exosomal miR-25-3p from mesenchymal stem cells alleviates myocardial infarction by targeting pro-apoptotic proteins and EZH2. *Cell Death Dis.* 2020;11(5):317.
- YU B, KIM HW, GONG M, et al. Exosomes secreted from GATA-4 overexpressing mesenchymal stem cells serve as a reservoir of anti-apoptotic microRNAs for cardioprotection. *Int J Cardiol.* 2015;182:349-360.
- CHENG H, CHANG S, XU R, et al. Hypoxia-challenged MSC-derived exosomes deliver miR-210 to attenuate post-infarction cardiac apoptosis. *Stem Cell Res Ther.* 2020;11(1):224.
- SONG Y, WANG B, ZHU X, et al. Human umbilical cord blood-derived MSCs exosome attenuate myocardial injury by inhibiting ferroptosis in acute myocardial infarction mice. *Cell Biol Toxicol.* 2021;37(1):51-64.
- WANG Y, ZHAO R, LIU D, et al. Exosomes derived from mir-214-enriched bone marrow-derived mesenchymal stem cells regulate oxidative damage in cardiac stem cells by targeting CaMKII. *Oxid Med Cell Longev.* 2018;2018:4971261.
- FERGUSON SW, WANG J, LEE CJ, et al. The microRNA regulatory landscape of MSC-derived exosomes: a systems view. *Sci Rep.* 2018;8(1):1419.
- HEFLICH RH, MITTELSTAEDT RA, MANJANATHA MG, et al. DNA sequence analysis of hprt mutations in lymphocytes from Sprague-Dawley rats treated with 7, 12-dimethylbenz[a]anthracene. *Environ Mol Mutagen.* 1996;28(1):5-12.
- PHILLIPS EN, XIA F, KELSEY KT, et al. Spectra of spontaneous and X-ray-induced mutations at the hprt locus in related human lymphoblast cell lines that express wild-type or mutant p53. *Radiat Res.* 1995;143(3):255-262.

- [44] HONG J, WANG Y, HU BC, et al. Transcriptional downregulation of microRNA-19a by ROS production and NF-kappaB deactivation governs resistance to oxidative stress-initiated apoptosis. *Oncotarget*. 2017;8(41):70967-70981.
- [45] TIMMERS L, LIM SK, ARSLAN F, et al. Reduction of myocardial infarct size by human mesenchymal stem cell conditioned medium. *Stem Cell Res*. 2007;1(2):129-137.
- [46] HAN C, ZHOU J, LIANG C, et al. Human umbilical cord mesenchymal stem cell derived exosomes encapsulated in functional peptide hydrogels promote cardiac repair. *Biomater Sci*. 2019;7(7):2920-2933.
- [47] GU X, LI Y, CHEN K, et al. Exosomes derived from umbilical cord mesenchymal stem cells alleviate viral myocarditis through activating AMPK/mTOR-mediated autophagy flux pathway. *J Cell Mol Med*. 2020;24(13):7515-7530.
- [48] GAO J, CHEN X, SHAN C, et al. Autophagy in cardiovascular diseases: role of noncoding RNAs. *Mol Ther Nucleic Acids*. 2021;23:101-118.
- [49] SHAO H, YANG L, WANG L, et al. MicroRNA-34a protects myocardial cells against ischemia-reperfusion injury through inhibiting autophagy via regulating TNFalpha expression. *Biochem Cell Biol*. 2018;96(3):349-354.
- [50] LI Q, GAO Y, ZHU J, et al. MiR-101 Attenuates myocardial infarction-induced injury by targeting DDIT4 to regulate autophagy. *Curr Neurovasc Res*. 2020;17(2):123-130.
- [51] HUANG Z, WU S, KONG F, et al. MicroRNA-21 protects against cardiac hypoxia/reoxygenation injury by inhibiting excessive autophagy in H9c2 cells via the Akt/mTOR pathway. *J Cell Mol Med*. 2017;21(3):467-474.
- [52] DING S, ABUDUPATER M, ZHOU Z, et al. Histamine deficiency aggravates cardiac injury through miR-206/216b-Atg13 axis-mediated autophagic-dependant apoptosis. *Cell Death Dis*. 2018;9(6):694.
- [53] ZHANG C, ZHANG C, WANG H, et al. Effects of miR103a3p on the autophagy and apoptosis of cardiomyocytes by regulating Atg5. *Int J Mol Med*. 2019;43(5):1951-1960.
- [54] ZHAO P, ZHANG B L, LIU K, et al. Overexpression of miR-638 attenuated the effects of hypoxia/reoxygenation treatment on cell viability, cell apoptosis and autophagy by targeting ATG5 in the human cardiomyocytes. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. 2018;22(23):8462-8471.
- [55] CHEN G, WANG M, RUAN Z, et al. Mesenchymal stem cell-derived exosomal miR-143-3p suppresses myocardial ischemia-reperfusion injury by regulating autophagy. *Life Sci*. 2021;280:119742.
- [56] TALMAN V, RUSKOAHO H. Cardiac fibrosis in myocardial infarction-from repair and remodeling to regeneration. *Cell Tissue Res*. 2016;365(3):563-581.
- [57] LUTHER KM, HAAR L, MCGUINNESS M, et al. Exosomal miR-21a-5p mediates cardioprotection by mesenchymal stem cells. *J Mol Cell Cardiol*. 2018;119:125-137.
- [58] 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.
- [59] WANG X, ZHU Y, WU C, et al. Adipose-derived mesenchymal stem cells-derived exosomes carry microRNA-671 to alleviate myocardial infarction through inactivating the TGFBR2/Smad2 axis. *Inflammation*. 2021;44(5):1815-1830.
- [60] MALGULWAR PB, PATHAK P, SINGH M, et al. Downregulation of SMARCB1/INI1 expression in pediatric chordomas correlates with upregulation of miR-671-5p and miR-193a-5p expressions. *Brain Tumor Pathol*. 2017;34(4):155-159.
- [61] WEI Z, QIAO S, ZHAO J, et al. miRNA-181a over-expression in mesenchymal stem cell-derived exosomes influenced inflammatory response after myocardial ischemia-reperfusion injury. *Life Sci*. 2019;232:116632.
- [62] ZHAO J, LI X, HU J, et al. Mesenchymal stromal cell-derived exosomes attenuate myocardial ischaemia-reperfusion injury through miR-182-regulated macrophage polarization. *Cardiovasc Res*. 2019;115(7):1205-1216.
- [63] DOMENIS R, CIFU A, QUAGLIA S, et al. Pro inflammatory stimuli enhance the immunosuppressive functions of adipose mesenchymal stem cells-derived exosomes. *Sci Rep*. 2018;8(1):13325.
- [64] BURRELLO J, MONTICONE S, GAI C, et al. Stem cell-derived extracellular vesicles and immune-modulation. *Front Cell Dev Biol*. 2016;4:83.
- [65] LAI RC, TAN SS, TEH BJ, et al. Proteolytic potential of the MSC exosome proteome: implications for an exosome-mediated delivery of therapeutic proteasome. *Int J Proteomics*. 2012;2012:971907.
- [66] KANG K, MA R, CAI W, et al. Exosomes secreted from CXCR4 overexpressing mesenchymal stem cells promote cardioprotection via akt signaling pathway following myocardial infarction. *Stem Cells Int*. 2015;2015:659890.
- [67] WANG X, CHEN Y, ZHAO Z, et al. Engineered exosomes with ischemic myocardium-targeting peptide for targeted therapy in myocardial infarction. *J Am Heart Assoc*. 2018;7(15):e8737.
- [68] NI J, LIU X, YIN Y, et al. Exosomes derived from timp2-modified human umbilical cord mesenchymal stem cells enhance the repair effect in rat model with myocardial infarction possibly by the Akt/Sfrp2 pathway. *Oxid Med Cell Longev*. 2019;2019:1958941.
- [69] CHEN Y, ZHAO Y, CHEN W, et al. MicroRNA-133 overexpression promotes the therapeutic efficacy of mesenchymal stem cells on acute myocardial infarction. *Stem Cell Res Ther*. 2017;8(1):268.
- [70] SEO HH, LEE SY, LEE CY, et al. Exogenous miRNA-146a enhances the therapeutic efficacy of human mesenchymal stem cells by increasing vascular endothelial growth factor secretion in the ischemia/reperfusion-injured heart. *J Vasc Res*. 2017;54(2):100-108.
- [71] HUANG P, WANG L, LI Q, et al. Atorvastatin enhances the therapeutic efficacy of mesenchymal stem cells-derived exosomes in acute myocardial infarction via up-regulating long non-coding RNA H19. *Cardiovasc Res*. 2020;116(2):353-367.
- [72] ZHU LP, TIAN T, WANG JY, et al. Hypoxia-elicited mesenchymal stem cell-derived exosomes facilitates cardiac repair through miR-125b-mediated prevention of cell death in myocardial infarction. *Theranostics*. 2018;8(22):6163-6177.
- [73] XU R, ZHANG F, CHAI R, et al. Exosomes derived from pro-inflammatory bone marrow-derived mesenchymal stem cells reduce inflammation and myocardial injury via mediating macrophage polarization. *J Cell Mol Med*. 2019;23(11):7617-7631.
- [74] PARK DJ, YUN WS, KIM WC, et al. Improvement of stem cell-derived exosome release efficiency by surface-modified nanoparticles. *J Nanobiotechnology*. 2020;18(1):178.
- [75] STEPHANOPOULOS N, ORTONY JH, STUPP SI. Self-Assembly for the Synthesis of Functional Biomaterials. *Acta Mater*. 2013;61(3):912-930.
- [76] WANG J, BONACQUISTI EE, BROWN AD, et al. Boosting the Biogenesis and Secretion of Mesenchymal Stem Cell-Derived Exosomes. *Cells*. 2020. doi: 10.3390/cells9030660.
- [77] CHEN CW, WANG LL, ZAMAN S, et al. Sustained release of endothelial progenitor cell-derived extracellular vesicles from shear-thinning hydrogels improves angiogenesis and promotes function after myocardial infarction. *Cardiovasc Res*. 2018;114(7):1029-1040.
- [78] LIU S, CHEN X, BAO L, et al. Treatment of infarcted heart tissue via the capture and local delivery of circulating exosomes through antibody-conjugated magnetic nanoparticles. *Nat Biomed Eng*. 2020;4(11):1063-1075.
- [79] WEI G, JIE Y, HAIBO L, et al. Dendritic cells derived exosomes migration to spleen and induction of inflammation are regulated by CCR7. *Sci Rep*. 2017;7:42996.
- [80] RODRIGUEZ PL, HARADA T, CHRISTIAN DA, et al. Minimal "Self" peptides that inhibit phagocytic clearance and enhance delivery of nanoparticles. *Science*. 2013;339(6122):971-975.
- [81] VRIJSEN KR, MARING JA, CHAMULEAU SA, et al. Exosomes from cardiomyocyte progenitor cells and mesenchymal stem cells stimulate angiogenesis via EMMPRIN. *Adv Healthc Mater*. 2016;5(19):2555-2565.
- [82] YAO J, HUANG K, ZHU D, et al. A minimally invasive exosome spray repairs heart after myocardial infarction. *ACS Nano*. 2021. doi: 10.1021/acsnano.1c00628.
- [83] ZHANG N, SONG Y, HUANG Z, et al. Monocyte mimics improve mesenchymal stem cell-derived extracellular vesicle homing in a mouse MI/RI model. *Biomaterials*. 2020;255:120168.
- [84] NIESWANDT B, WATSON SP. Platelet-collagen interaction: is GpVI the central receptor? *Blood*. 2003;102(2):449-461.
- [85] BUTLER LM, METSON-SCOTT T, FELIX J, et al. Sequential adhesion of platelets and leukocytes from flowing whole blood onto a collagen-coated surface: requirement for a GpVI-binding site in collagen. *Thromb Haemost*. 2007;97(5):814-821.
- [86] HU CM, FANG RH, WANG KC, et al. Nanoparticle biointerfacing by platelet membrane cloaking. *Nature*. 2015;526(7571):118-121.
- [87] 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.
- [88] LENER T, GIMONA M, AIGNER L, et al. Applying extracellular vesicles based therapeutics in clinical trials- an ISEV position paper. *J Extracell Vesicles*. 2015;4:30087.

(责任编辑: WJ, ZN, ZH)