

# 间充质干细胞外泌体在创面愈合和增生性瘢痕防治方面的研究进展

孙锦 史宸硕 王达利

遵义医科大学附属医院烧伤整形外科 563003

通信作者:王达利, Email: daliwangzy@sina.com

**【摘要】** 皮肤是人体重要的防御屏障,也是最容易受到损伤的器官之一。创面是皮肤完整性遭受破坏的结果;慢性创面和增生性瘢痕形成是创面异常愈合的结果,也是目前创伤修复领域亟待解决的临床问题。近年来,研究者观察到间充质干细胞(MSC)具有促进创面愈合、提高创面愈合质量、减少瘢痕形成的作用, MSC的治疗作用可能源于其所衍生的外泌体。本文简述了近年来 MSC 外泌体在创面愈合与增生性瘢痕防治方面的研究进展并对其临床应用前景进行了展望。

**【关键词】** 伤口愈合; 间充质干细胞; 外泌体; 增生性瘢痕

**基金项目:**国家自然科学基金面上项目(81871570)

## Research advances on the roles of exosomes derived from mesenchymal stem cells in wound healing and prevention and treatment of hypertrophic scars

Sun Jin, Shi Chenshuo, Wang Dali

Department of Burns and Plastic Surgery, the Affiliated Hospital of Zunyi Medical University, Zunyi 563003, China

Corresponding author: Wang Dali, Email: daliwangzy@sina.com

**【Abstract】** Skin is an important defense barrier of human body and one of the most vulnerable organs. Wounds are the result of damage to the integrity of skin. Chronic wounds and hypertrophic scar formation are the results of abnormal wound healing, and are also the clinical problems those need to be resolved urgently in the field of wound repair. In recent years, researchers have found that mesenchymal stem cells (MSCs) can promote wound healing, improve wound healing quality, and reduce scar formation. The therapeutic effect of MSCs may be derived from the exosomes derived from them. This paper reviews the research advances of exosomes derived from MSCs in wound healing and prevention and treatment of hypertrophic scars in re-

cent years and looks up to the prospect for the clinical application.

**【Key words】** Wound healing; Mesenchymal stem cells; Exosomes; Hypertrophic scar

**Fund program:** General Program of National Natural Science Foundation of China (81871570)

严重创伤、糖尿病、血管功能不全性疾病以及大面积烧伤等引起的创面长期存在,极大地影响患者的生活质量,甚至会增加患者病死率,同时创面过度愈合导致的病理性瘢痕可引起机体外形的毁损和不同程度的功能障碍,给患者身心健康带来危害。近年来大量研究证实间充质干细胞(MSC)能够有效促进各种急慢性创面的愈合,减轻瘢痕形成,并且已进入临床试验阶段<sup>[1]</sup>。早期研究认为这种治疗潜能是由于 MSC 归巢并分化、代替了损伤组织<sup>[2]</sup>。近年研究认为 MSC 主要以内分泌和旁分泌的方式分泌营养因子发挥免疫调节及促进再生等作用<sup>[3]</sup>。2010 年 Lai 等<sup>[4]</sup>分离出了起修复作用的 MSC 营养因子,证实其为 MSC 外泌体。外泌体是 MSC 分泌的同质性囊泡,含有丰富的蛋白质、核酸等活性物质,在干细胞与损伤细胞信息交流中发挥关键作用<sup>[5]</sup>。多数研究者认为, MSC 外泌体是 MSC 旁分泌的主要有效成分并发挥着与其几乎相同的生物学效应,同时能够避免 MSC 直接移植所面临的潜在风险及储存运输等问题,为“无细胞”治疗提供了新的可能。本文就 MSC 外泌体的生物学特征及其在治疗创面和增生性瘢痕中的研究进展综述如下。

## 1 外泌体介绍

### 1.1 外泌体的来源及功能

20 世纪 80 年代, Pan 等<sup>[6]</sup>在绵羊网织红细胞成熟过程中,观察到红细胞能将某些代谢物通过一些小囊泡分泌到细胞外。随后,上述现象再次在 Johnstone 等<sup>[7]</sup>的实验中得到证实。最终,这种小囊泡被命名为“外泌体”。细胞外囊泡是磷脂双分子层封闭性亚细胞结构,通常呈球形或盘状,直径为几纳米至几微米。目前认为细胞外囊泡分为 3 个亚型——外泌体、微囊泡和凋亡小体<sup>[8]</sup>,外泌体是其中直径 30~100 nm 的膜性小囊泡<sup>[9]</sup>。起初,细胞外囊泡直径被认为是区分这 3 种亚型的主要决定因素<sup>[10]</sup>。随着研究的深入,观察到细胞外囊泡的生物发生、分泌途径、表面标志物和生理功能也是

DOI: 10.3760/cma.j.cn501120-20200410-00220

本文引用格式:孙锦,史宸硕,王达利.间充质干细胞外泌体在创面愈合和增生性瘢痕防治方面的研究进展[J].中华烧伤杂志,2021,37(5):495-500. DOI: 10.3760/cma.j.cn501120-20200410-00220.

Sun J, Shi CH, Wang DL. Research advances on the roles of exosomes derived from mesenchymal stem cells in wound healing and prevention and treatment of hypertrophic scars[J]. Chin J Burns, 2021, 37(5): 495-500. DOI: 10.3760/cma.j.cn501120-20200410-00220.

区别它们的关键因素<sup>[11]</sup>。细胞外囊泡主要通过旁分泌、邻位分泌以及内分泌信号的方式参与细胞内的信号传递<sup>[12]</sup>。此外,外泌体的磷脂双分子层如细胞膜般提供了一个可控的微环境,保护其内容物在参与细胞间信号传递时不被降解<sup>[13]</sup>。正常状态或病理状态下,机体细胞均能产生外泌体,且其广泛存在于血液、尿液、唾液、羊水、关节滑液,以及支气管肺泡灌洗液、胸腔积液、恶性腹水等液体中<sup>[14-16]</sup>。

### 1.2 外泌体的分离和检测

外泌体存在于各种体液或培养液中,根据外泌体的大小、密度、免疫原性等,可以采用不同的技术将外泌体从体液或培养液中分离,常见的分离方法有 5 种。(1)超速离心法,是目前使用最广泛的方法,被称为分离外泌体的金标准<sup>[17]</sup>,通过低速离心与高速离心交替的方式可得到纯度较高的外泌体,但是这种方法耗时、产量低。(2)超滤离心法,是利用超滤膜孔径截留分子量孔径较小的外泌体进行选择性分离外泌体的方法<sup>[18]</sup>。(3)聚合物沉淀法,是利用聚合物吸附大量水分子,使外泌体在水中的溶解度下降,再低速离心获得外泌体的沉降物,但是所获得外泌体的纯度较低,常伴有杂质。(4)免疫亲和法,是利用共价抗体吸附标记的磁珠与外泌体结合,将外泌体吸附并分离出来<sup>[19]</sup>。(5)微流体衍生的分离技术,近年来被认为是一种更具前景的选择性分离外泌体的方法,这种方法利用外泌体的理化特性如密度、直径、免疫亲和力等大幅减少外泌体的提取时间、试剂消耗<sup>[20]</sup>。

外泌体分离后的检测技术有多种,如纳米粒子跟踪分析技术、动态光散射技术、电阻式脉冲传感技术、原子力显微镜技术、透射电子显微镜技术等均能正确有效地检测外泌体相关性质。其中,透射电子显微镜技术是一种常用的外泌体检测技术,能够提供外泌体的形状和结构信息,镜下所获的外泌体图像质量较高<sup>[21]</sup>。

### 1.3 MSC 及其衍生的外泌体的作用

MSC 可从骨髓、脂肪、牙髓、脐带等多种组织中分离培养获取<sup>[22]</sup>。研究表明 MSC 主要通过以下 6 个方面促进创面愈合。(1)通过调节巨噬细胞及 T 细胞功能,下调促炎性细胞干扰素- $\gamma$ 、IL-6、IL-8 等,上调抗炎因子 IL-4、IL-10 等,削弱局部炎症反应。(2)中和创面活性氧,减轻瘢痕或纤维化形成。(3)产生抗纤维化因子、肝细胞生长因子(HGF)、IL-10 等,下调 Fb 中 TGF- $\beta_1$  及 I、III 型前胶原表达。(4)产生 HGF 和前列腺素 E2,抑制上皮或内皮细胞发生上皮-间充质转化,抑制其向肌 Fb 的分化,增强真皮 Fb 的促创面愈合功能。(5)产生碱性 FGF 和 VEGF-A 促进血管生成,增强血管稳定性。(6)在创面局部分化为参与创面愈合的各类真皮细胞,体外特定条件下还可分化为 KC、微血管内皮细胞等<sup>[1]</sup>。

近年来,越来越多的研究证据表明,MSC 在创面修复过程中所展现出来的调节创面微环境、募集内源性干细胞、促进组织再生(包括细胞增殖、迁移,ECM 合成)的功能主要依靠其旁分泌的外泌体来实现<sup>[3]</sup>。MSC 的旁分泌作用最早由 Haynesworth 等<sup>[23]</sup>观察到。研究表明 MSC 是产生外泌体能力极强的细胞<sup>[24]</sup>,与 MSC 比较,其外泌体具有以下优点。(1)可

直接与靶细胞发生融合进而发挥生物学效应,作用效率更高。(2)能够在-70℃下长期稳定保存,内含的有效成分受外泌体脂质膜保护,不易被破坏,且更便于运输。(3)使用时间易于掌握,使用浓度、剂量及途径更易控制。(4)没有移植细胞带来的免疫排斥反应和肿瘤形成风险。(5)避免了直接使用 MSC 造成的血管栓塞等并发症<sup>[25]</sup>。因此,外泌体被认为是未来 MSC 治疗的潜在替代品<sup>[25]</sup>,迅速成为目前组织损伤修复与再生医学的研究热点。

## 2 MSC 外泌体在创面愈合及治疗增生性瘢痕中的作用

### 2.1 调控创面的炎症反应

有研究表明,胎儿皮肤的无瘢痕愈合不仅因为胎儿在皮肤损伤后没有炎症反应,还与胎儿创面与成人创面 ECM 成分、生长因子表达和细胞存在着差异等有关<sup>[26]</sup>。出生后,炎症反应是机体清除受损组织、抵御异物必不可少的防御手段<sup>[27]</sup>,创面愈合过程中,局部巨噬细胞逐渐由促炎表型 M1 向抗炎表型 M2 转变<sup>[28]</sup>。M1 型巨噬细胞通过释放诱导型 NOS、TNF 和 IL-1 $\beta$  等促炎性细胞因子而表现出促炎功能<sup>[29]</sup>。相反,M2 型巨噬细胞通过表达 IL-10、TGF- $\beta$  和精氨酸酶 1 等表现出抗炎和修复功能<sup>[30-31]</sup>。随着巨噬细胞由 M1 型向 M2 型转化,创面炎症期过渡到增殖期,启动组织修复和重塑<sup>[32]</sup>。因此,巨噬细胞对创面愈合、增生性瘢痕形成有重要作用。Cosenza 等<sup>[33]</sup>研究表明,MSC 衍生的外泌体可抑制 M1 型巨噬细胞,且可能诱导其向 M2 型巨噬细胞转变。另一项研究显示,LPS 预处理的 MSC 通过外泌体促进了疾病中炎症反应的巨噬细胞向 M2 型极化和组织修复<sup>[34]</sup>。此外,MSC 外泌体可抑制免疫细胞如 T 细胞、B 细胞或自然杀伤细胞增殖,发挥免疫抑制作用,避免过度炎症反应<sup>[32]</sup>。MSC 外泌体也可调节炎症因子表达。Li 等<sup>[35]</sup>研究表明,人脐带 MSC 外泌体可减少白细胞总数并下调 Toll 样受体 4、核因子  $\kappa$ B/P65 和磷酸化 P65 等蛋白的表达,从而阻止了炎症因子如 IL-1 $\beta$  和 TNF- $\alpha$  的释放。除了炎症因子和趋化因子,外泌体中的微小 RNA(miR)在炎症反应中也起作用,Alexander 等<sup>[36]</sup>观察到 miR-155 和 miR-146a 是调节炎症的 2 个关键分子,在小鼠模型中通过外泌体给药 miR-146a 可下调炎症基因表达并减轻 LPS 诱导的炎症反应,从而促进创面愈合。由此可见,MSC 外泌体在改善巨噬细胞功能,减轻炎症反应中具有积极作用。

### 2.2 促进创面的血管生成

新生血管对于创面愈合是必不可少的,而其形成缓慢可能导致慢性创面或增生性瘢痕。血管生成属于创面增殖期的一部分,内皮细胞的增殖需要新生血管的营养支持。随着研究的深入,科研人员观察到 MSC 外泌体在促进创面血管生成中发挥重要作用<sup>[37]</sup>。Li 等<sup>[38]</sup>研究表明,外泌体不仅通过抑制促炎介质和炎症因子的分泌而且通过显著加速糖尿病创面血管的生成速率,发挥抗炎作用从而改善创面修复质量。有研究表明,人脐带 MSC 外泌体通过激活 Wnt-4/ $\beta$ -链蛋白通路,促进大鼠皮肤烧伤模型创面的血管生成<sup>[39]</sup>。

Pendergrass 等<sup>[40]</sup>报道了过氧化氢预处理的 MSC 诱导血管新生的能力增强,使心肌纤维化减少。Bai 等<sup>[41]</sup>进一步研究显示低剂量过氧化氢可能使 MSC 外泌体显示出更强的促血管生成能力,从而提高缺血再灌注损伤的皮瓣成活率,并减轻炎症反应及减少细胞凋亡。人脐静脉内皮细胞常用于内皮增殖和管腔形成试验的评估,Gong 等<sup>[42]</sup>观察到 MSC 外泌体能够在体外促进人脐静脉内皮细胞血管管样结构形成。另外,低氧环境已被证明可影响 MSC 释放外泌体<sup>[43]</sup>。在低氧条件下,人脂肪 MSC 可释放外泌体激活蛋白激酶 A 途径,改善血管生成<sup>[44]</sup>。低氧浓度还可促进人牙髓 MSC 外泌体分泌从而激活 Jagged1/Notch 通路,提高外泌体在人脐静脉内皮细胞中诱导毛细血管形成的能力<sup>[43]</sup>。与低氧类似,一氧化碳也能诱导 MSC 的促血管生成能力。研究表明,miR-126 在一氧化氮刺激 MSC 的外泌体中表达增强,从而更好地促进血管生成<sup>[45]</sup>。人脐静脉内皮细胞外泌体携带可诱导血管生成的生长因子(FGF、VEGF、TGF- $\beta_1$ 、HGF、结缔组织生长因子和 IL-6)的 mRNA,并诱导人脐静脉内皮细胞的毛细血管形成<sup>[46-47]</sup>。

### 2.3 促进创面愈合和细胞增殖

在增殖期,Fb、内皮细胞等共同形成创面的肉芽组织,随后 Fb 参与形成富含纤维蛋白、强度更高的 ECM 改善创面愈合<sup>[48]</sup>。新生成的 ECM 主要包含 I、III 型纤维状胶原蛋白,而在较成熟的肉芽组织中,III 型胶原最终被 I 型胶原所取代,成为瘢痕主要 ECM 的成分<sup>[49]</sup>。有研究观察到,MSC 外泌体可以促进皮肤细胞(如 Fb 和 KC)的迁移和增殖,加速创面愈合<sup>[50]</sup>。Choi 等<sup>[51]</sup>也观察到人脂肪 MSC 外泌体可以加速 Fb 和 KC 的迁移和增殖。进一步研究表明,人脂肪 MSC 外泌体似乎以剂量依赖型的方式优化 Fb 的生理特性<sup>[52]</sup>。Fb 内化 MSC 外泌体后表现出更高表达细胞周期蛋白 1、N-钙黏蛋白、增殖细胞核抗原、I 型胶原和 III 型胶原的能力<sup>[52]</sup>。其他类型的 MSC 也被证明拥有相同的功效。例如,McBride 等<sup>[53]</sup>观察到骨髓 MSC 产生的外泌体可以促进 Fb 的迁移和增殖,并能诱导血管生成。Kim 等<sup>[54]</sup>通过实验证明,人脐带 MSC 外泌体能刺激 Fb 增殖和迁移,并能促进胶原蛋白和弹性蛋白的合成,以及各种生长因子的分泌,特别是 EGF 和碱性 FGF,从而促进创面愈合。此外,Tooi 等<sup>[55]</sup>观察到胎盘干细胞中分离出的外泌体改善了人 Fb 的可塑性。Zhang 等<sup>[56]</sup>的研究表明人脐带 MSC 外泌体能够通过激活蛋白激酶 B 通路诱导人 KC 和 Fb 的增殖。

### 2.4 减少瘢痕形成

瘢痕形成是组织重塑期的一部分,也是整个创面愈合的最终阶段,增生性瘢痕是肌 Fb 产生胶原异常沉积和皮肤功能紊乱的结果。在小鼠模型中,炎症阶段缺乏巨噬细胞会降低组织的愈合率,甚至导致伤口无法愈合<sup>[57]</sup>。相反,不能通过细胞凋亡等途径清除过多的巨噬细胞,以及超过急性修复期还存在的巨噬细胞,将导致创面的过度愈合及纤维化<sup>[58]</sup>。由此可见,Fb 及巨噬细胞的功能对于创面愈合有重要作用。大量研究已经证明外泌体具有调节炎症的作用,但是外泌体

能否调节创面纤维化需要做进一步研究。Zhao 等<sup>[59]</sup>报道,人羊膜 MSC 外泌体能够通过控制 ECM 的沉积来减少瘢痕形成,该团队还观察到纤维组织也被外泌体改善,使之更接近正常皮肤。Wang 等<sup>[60]</sup>观察到静脉注射人脂肪 MSC 外泌体可缩小瘢痕面积、防止 Fb 分化为肌 Fb、提高 TGF- $\beta_3$  与 TGF- $\beta_1$  的比值。近年的研究表明,在伤口愈合早期,人脂肪 MSC 的外泌体会诱导胶原蛋白的表达;但在晚期,这些外泌体则会抑制胶原蛋白的表达,从而减少瘢痕形成<sup>[51]</sup>。不仅如此,Pelizzo 等<sup>[61]</sup>研究表明,兔脂肪和骨髓来源的 MSC 外泌体在体内促进伤口愈合方面优于干细胞注射;通过实验对比,研究者还指出,脂肪 MSC 外泌体比骨髓 MSC 外泌体能更有效地促进伤口愈合。Kim 等<sup>[54]</sup>研究了人脐带 MSC 外泌体通过调节胶原蛋白的产生和渗透来活化皮肤的能力,他们观察到经外泌体处理后的皮肤细胞具有更强的增殖能力,还观察到皮肤细胞能更好地产生胶原蛋白和弹性蛋白。上述这些研究表明,MSC 外泌体在 ECM 重塑中具有重要作用,是减少瘢痕形成的可能机制。

## 3 MSC 外泌体的临床应用前景和限制及其改进

### 3.1 开发为生物材料

MSC 外泌体在治疗创面愈合及减轻瘢痕形成方面具有巨大潜力。但是,由于创面清除速度快,用于创面愈合的外泌体疗法仍然面临挑战<sup>[62]</sup>。因此,开发能够运载大剂量且能在创面持续释放并维持外泌体功能的生物相容性支架对外泌体的创面愈合治疗至关重要。生物医学水凝胶敷料作为一种很有前景的支架材料,在创面愈合和皮肤组织功能重建中可有效地传递药物或细胞<sup>[63-64]</sup>。Wang 等<sup>[65]</sup>基于外泌体的创面治疗,成功开发了一种具有热敏性、可注射、抗菌止血等多种功能的外泌体水凝胶支架 FEP@exo,不仅可以促进糖尿病创面的愈合,而且可以在创面持续释放外泌体并保持外泌体的生物活性。Shi 等<sup>[66]</sup>制备了一种可生物降解且具有生物相容性的载体——壳聚糖-丝水凝胶海绵,用其运载人牙龈 MSC 外泌体,能显著促进大鼠糖尿病创面的愈合。最近,Han 等<sup>[67]</sup>从人脐带 MSC 上清液中分离出含有 miR-675 的外泌体,与超声处理的丝素蛋白溶液混合,形成含 miR-675 的外泌体纤维蛋白水凝胶,该水凝胶在体外和体内均可持续释放外泌体,延长了外泌体和 miR-675 的作用时间。上述研究表明,开发外泌体-生物材料在干预创面愈合、治疗增生性瘢痕中具有可行性及重要性。

### 3.2 外泌体疗法的限制

目前对外泌体治疗创面及增生性瘢痕的认识有所提高,但仍存在着局限性。早期,外泌体的局部注射、静脉注射等,均证明有治疗效果,是简单、无创的治疗手段,但直接使用的外泌体易被清除,无法持续地发挥作用。外泌体水凝胶等生物材料一定程度上解决了这一问题,但是从条件培养基中获取的外泌体剂量较低,不能达到治疗所需的高剂量。因此大规模生产外泌体对其临床应用是必须的。目前外泌体的分离提取较为复杂烦琐,导致其价格高昂。如何降低外泌体在

临床治疗中的价格,让多数患者容易接受是研究者需要解决的问题。另外,Hu等<sup>[68]</sup>提出在标准实验室的培养条件下,可从条件培养基上清液中分离MSC外泌体,但其能否完全满足复杂创面微环境的应用值得探讨。

### 3.3 外泌体疗法的改进

现已了解到MSC外泌体在治疗增生性瘢痕中有积极作用,也有局限,所以需要利用生物工程手段对外泌体疗法予以支持。有研究证实,可以通过生物工程手段改变外泌体的内容物如蛋白质、核酸等,以将其用于癌症、炎症、神经系统再生等领域<sup>[69]</sup>。有研究者观察到,可以通过使用生物反应器获得大量外泌体,其产量为T型培养瓶或细胞工厂等的10倍,能达到以mg为单位的产量<sup>[70]</sup>。对于外泌体的改进,则有以下多种方法。(1)治疗药物与外泌体共同孵育:将特定药物与外泌体共同培养,药物可沿着浓度梯度扩散到外泌体内,Haney等<sup>[71]</sup>成功地将过氧化氢酶导入从RAW264.7小鼠细胞中提取的外泌体中。(2)治疗药物与供体细胞共同孵育:供体细胞经药物处理后,分泌含有药物的外泌体,Pascucci等<sup>[72]</sup>用低剂量紫杉醇处理SR4987大鼠的MSC,然后从处理后的细胞中成功提取了含紫杉醇的外泌体,与未经处理细胞分泌的外泌体相比具有更好的治疗效果。(3)电穿孔法:该方法通过将电场作用于悬浮在导电溶液中的外泌体,扰乱磷脂双分子层,外泌体膜上产生临时孔隙,药物可经由孔隙进入外泌体中,然后在载药过程结束后恢复外泌体膜的完整性。这种方法被广泛应用于将小干扰RNA或miR载入外泌体,其转染效率高于化学转染方法<sup>[73]</sup>。(4)化学共价法:通过共价键将目的分子直接连接到外泌体表面,是一种理想的外泌体改造方式<sup>[74]</sup>。(5)基因转染:将供体细胞用携带目的基因的质粒转染,细胞合成目的基因编码的蛋白质,这些蛋白质将随外泌体一同分泌。Ohno等<sup>[75]</sup>成功从转染let-7a miR的供体细胞中分离出外泌体,并用其抑制小鼠肿瘤的生长。以上仅是生物工程对发展外泌体疗法的“冰山一角”,可见生物工程对于外泌体疗法具有巨大的推动作用。

### 4 小结与展望

目前外泌体已被广泛研究,它们在减轻炎症反应、改善细胞功能等方面展示了良好的临床应用前景,成为促进创面愈合与拮抗增生性瘢痕形成无细胞治疗剂的可能。上述研究证明MSC外泌体可通过促进上皮细胞、内皮细胞和Fb的增殖、迁移,促进创面愈合;调节血管生成、胶原合成和ECM的重塑减少瘢痕形成。同时,通过各种生物与物理技术改进和优化MSC外泌体的产量以及其有效成分如某些核酸等,使MSC外泌体生物效应得到进一步提高。目前虽已证明外泌体在安全性和疗效方面均具有较好的应用前景,但仍需要更多的临床试验促进其临床转化应用。

**利益冲突** 所有作者均声明不存在利益冲突

### 参考文献

[1] Jackson WM, Nesti LJ, Tuan RS. Mesenchymal stem cell therapy

for attenuation of scar formation during wound healing[J]. *Stem Cell Res Ther*, 2012, 3(3):20. DOI:10.1186/scrt111.

- [2] Phinney DG, Prockop DJ. Concise review: mesenchymal stem/multipotent stromal cells: the state of transdifferentiation and modes of tissue repair--current views[J]. *Stem Cells*, 2007, 25(11): 2896-2902. DOI:10.1634/stemcells.2007-0637.
- [3] Keshtkar S, Azarpira N, Ghahremani MH. Mesenchymal stem cell-derived extracellular vesicles: novel frontiers in regenerative medicine[J]. *Stem Cell Res Ther*, 2018, 9(1):63. DOI:10.1186/s13287-018-0791-7.
- [4] Lai RC, Arslan F, Lee MM, et al. Exosome secreted by MSC reduces myocardial ischemia/reperfusion injury[J]. *Stem Cell Res*, 2010, 4(3):214-222. DOI:10.1016/j.scr.2009.12.003.
- [5] Yu B, Zhang X, Li X. Exosomes derived from mesenchymal stem cells[J]. *Int J Mol Sci*, 2014, 15(3): 4142-4157. DOI: 10.3390/ijms15034142.
- [6] Pan BT, Teng K, Wu C, et al. Electron microscopic evidence for externalization of the transferrin receptor in vesicular form in sheep reticulocytes[J]. *J Cell Biol*, 1985, 101(3): 942-948. DOI: 10.1083/jcb.101.3.942.
- [7] Johnstone RM, Adam M, Hammond JR, et al. Vesicle formation during reticulocyte maturation. Association of plasma membrane activities with released vesicles (exosomes)[J]. *J Biol Chem*, 1987, 262(19):9412-9420.
- [8] Yáñez-Mó M, Siljander PR, Andreu Z, et al. Biological properties of extracellular vesicles and their physiological functions[J]. *J Extracell Vesicles*, 2015, 4:27066. DOI:10.3402/jev.v4.27066.
- [9] Li Z, Wang Y, Xiao K, et al. Emerging role of exosomes in the joint diseases[J]. *Cell Physiol Biochem*, 2018, 47(5): 2008-2017. DOI: 10.1159/000491469.
- [10] Witwer KW, Buzás EI, Bemis LT, et al. Standardization of sample collection, isolation and analysis methods in extracellular vesicle research[J]. *J Extracell Vesicles*, 2013, 2. DOI:10.3402/jev.v2i0.20360.
- [11] Lötvall J, Hill AF, Hochberg F, et al. Minimal experimental requirements for definition of extracellular vesicles and their functions: a position statement from the International Society for Extracellular Vesicles[J]. *J Extracell Vesicles*, 2014, 3:26913. DOI: 10.3402/jev.v3.26913.
- [12] Lo Cicero A, Stahl PD, Raposo G. Extracellular vesicles shuffling intercellular messages: for good or for bad[J]. *Curr Opin Cell Biol*, 2015, 35:69-77. DOI:10.1016/j.ceb.2015.04.013.
- [13] Eldh M, Ekström K, Valadi H, et al. Exosomes communicate protective messages during oxidative stress; possible role of exosomal shuttle RNA[J]. *PLoS One*, 2010, 5(12): e15353. DOI: 10.1371/journal.pone.0015353.
- [14] Colombo M, Raposo G, Théry C. Biogenesis, secretion, and intercellular interactions of exosomes and other extracellular vesicles[J]. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 2014, 30: 255-289. DOI: 10.1146/annurev-cellbio-101512-122326.
- [15] Zhang Y, Liu Y, Liu H, et al. Exosomes: biogenesis, biologic function and clinical potential[J]. *Cell Biosci*, 2019, 9: 19. DOI: 10.1186/s13578-019-0282-2.
- [16] Konala VB, Mamidi MK, Bhonde R, et al. The current landscape of the mesenchymal stromal cell secretome: a new paradigm for cell-free regeneration[J]. *Cytotherapy*, 2016, 18(1): 13-24. DOI: 10.1016/j.jcyt.2015.10.008.
- [17] Théry C, Amigorena S, Raposo G, et al. Isolation and characterization of exosomes from cell culture supernatants and biological fluids[J]. *Curr Protoc Cell Biol*, 2006, Chapter 3: Unit 3.22. DOI: 10.1002/0471143030.cb0322s30.

- [18] Cheruvanky A,Zhou H,Pisitkun T,et al.Rapid isolation of urinary exosomal biomarkers using a nanomembrane ultrafiltration concentrator[J]. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2007, 292(5): F1657-1661.DOI:10.1152/ajprenal.00434.2006.
- [19] Fitzgerald J,Leonard P,Darcy E,et al.Immunofluorescence chromatography: concepts and applications[J].*Methods Mol Biol*,2017,1485: 27-51.DOI:10.1007/978-1-4939-6412-3\_3.
- [20] Yang F,Liao X,Tian Y,et al.Exosome separation using microfluidic systems: size-based, immunofluorescence-based and dynamic methodologies[J].*Biotechnol J*,2017,12(4).DOI:10.1002/biot.201600699.
- [21] Rikkers LG, Nieuwland R, Terstappen L, et al. Quality of extracellular vesicle images by transmission electron microscopy is operator and protocol dependent[J].*J Extracell Vesicles*,2019, 8(1):1555419.DOI:10.1080/20013078.2018.1555419.
- [22] Pers YM,Ruiz M,Noël D,et al.Mesenchymal stem cells for the management of inflammation in osteoarthritis: state of the art and perspectives[J].*Osteoarthritis Cartilage*, 2015, 23(11):2027-2035. DOI:10.1016/j.joca.2015.07.004.
- [23] Haynesworth SE, Baber MA, Caplan AI. Cytokine expression by human marrow-derived mesenchymal progenitor cells in vitro: effects of dexamethasone and IL-1 alpha[J].*J Cell Physiol*,1996, 166(3): 585-592. DOI: 10.1002/(SICI)1097-4652(199603)166:3<585::AID-JCP13>3.0.CO;2-6.
- [24] Yeo RW, Lai RC, Zhang B, et al. Mesenchymal stem cell: an efficient mass producer of exosomes for drug delivery[J]. *Adv Drug Deliv Rev*,2013,65(3):336-341.DOI:10.1016/j.addr.2012.07.001.
- [25] Kishi K, Okabe K, Shimizu R, et al. Fetal skin possesses the ability to regenerate completely: complete regeneration of skin [J]. *Keio J Med*, 2012, 61(4): 101-108. DOI: 10.2302/kjm.2011-0002-ir.
- [26] Lu K,Li HY,Yang K,et al.Exosomes as potential alternatives to stem cell therapy for intervertebral disc degeneration: in-vitro study on exosomes in interaction of nucleus pulposus cells and bone marrow mesenchymal stem cells[J].*Stem Cell Res Ther*, 2017,8(1):108.DOI:10.1186/s13287-017-0563-9.
- [27] Oishi Y, Manabe I. Macrophages in inflammation, repair and regeneration[J].*Int Immunol*,2018,30(11):511-528.DOI:10.1093/intimm/dxy054.
- [28] Krzyszczyk P,Schloss R,Palmer A,et al.The role of macrophages in acute and chronic wound healing and interventions to promote pro-wound healing phenotypes[J].*Front Physiol*,2018,9:419.DOI: 10.3389/fphys.2018.00419.
- [29] Mills CD.M1 and M2 macrophages: oracles of health and disease [J]. *Crit Rev Immunol*, 2012, 32(6): 463-488. DOI: 10.1615/critrevimmunol.v32.i6.10.
- [30] Mills CD. Anatomy of a discovery: M1 and M2 macrophages[J]. *Front Immunol*,2015,6:212.DOI:10.3389/fimmu.2015.00212.
- [31] Krenkel O,Tacke F.Liver macrophages in tissue homeostasis and disease[J].*Nat Rev Immunol*,2017,17(5):306-321.DOI:10.1038/nri.2017.11.
- [32] Lucas T, Waisman A, Ranjan R, et al. Differential roles of macrophages in diverse phases of skin repair[J].*J Immunol*,2010, 184(7):3964-3977.DOI:10.4049/jimmunol.0903356.
- [33] Cosenza S, Ruiz M, Maumus M, et al. Pathogenic or therapeutic extracellular vesicles in rheumatic diseases: role of mesenchymal stem cell-derived vesicles[J].*Int J Mol Sci*,2017,18(4):889.DOI: 10.3390/ijms18040889.
- [34] 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]. *J Transl Med*,2015,13:308.DOI:10.1186/s12967-015-0642-6.
- [35] Li X,Liu L,Yang J,et al.Exosome derived from human umbilical cord mesenchymal stem cell mediates MiR-181c attenuating burn-induced excessive inflammation[J].*EBioMedicine*, 2016, 8: 72-82.DOI:10.1016/j.ebiom.2016.04.030.
- [36] Alexander M, Hu R, Runtsch MC, et al. Exosome-delivered microRNAs modulate the inflammatory response to endotoxin[J]. *Nat Commun*,2015,6:7321.DOI:10.1038/ncomms8321.
- [37] Ribeiro MF,Zhu H,Millard RW,et al.Exosomes function in pro- and anti-angiogenesis[J].*Curr Angiogenesis*,2013,2(1):54-59.DOI: 10.2174/22115528113020020001.
- [38] Li M, Wang T, Tian H, et al. Macrophage-derived exosomes accelerate wound healing through their anti-inflammation effects in a diabetic rat model[J].*Artif Cells Nanomed Biotechnol*,2019, 47(1):3793-3803.DOI:10.1080/21691401.2019.1669617.
- [39] Zhang B,Wu X,Zhang X,et al.Human umbilical cord mesenchymal stem cell exosomes enhance angiogenesis through the Wnt4/ $\beta$ -catenin pathway[J].*Stem Cells Transl Med*,2015,4(5):513-522. DOI:10.5966/sctm.2014-0267.
- [40] Pendergrass KD,Boopathy AV,Seshadri G,et al.Acute preconditioning of cardiac progenitor cells with hydrogen peroxide enhances angiogenic pathways following ischemia-reperfusion injury[J]. *Stem Cells Dev*, 2013, 22(17): 2414-2424. DOI: 10.1089/scd.2012.0673.
- [41] Bai Y,Han YD,Yan XL,et al.Adipose mesenchymal stem cell-derived exosomes stimulated by hydrogen peroxide enhanced skin flap recovery in ischemia-reperfusion injury[J].*Biochem Biophys Res Commun*,2018,500(2):310-317.DOI:10.1016/j.bbrc.2018.04.065.
- [42] Gong M, Yu B, Wang J, et al. Mesenchymal stem cells release exosomes that transfer miRNAs to endothelial cells and promote angiogenesis[J]. *Oncotarget*, 2017, 8(28): 45200-45212. DOI: 10.18632/oncotarget.16778.
- [43] Gonzalez-King H, Garcia NA, Ontoria-Oviedo I, et al. Hypoxia inducible factor-1 $\alpha$  potentiates jagged 1-mediated angiogenesis by mesenchymal stem cell-derived exosomes[J].*Stem Cells*,2017, 35(7):1747-1759.DOI:10.1002/stem.2618.
- [44] Xue C,Shen Y,Li X,et al.Exosomes derived from hypoxia-treated human adipose mesenchymal stem cells enhance angiogenesis through the PKA signaling pathway[J]. *Stem Cells Dev*, 2018, 27(7):456-465.DOI:10.1089/scd.2017.0296.
- [45] Du W,Zhang K,Zhang S,et al.Enhanced proangiogenic potential of mesenchymal stem cell-derived exosomes stimulated by a nitric oxide releasing polymer[J].*Biomaterials*, 2017, 133: 70-81. DOI:10.1016/j.biomaterials.2017.04.030.
- [46] Dostert G,Willemin AS,Jouan-Hureaux V,et al.Evaluation of the pro-angiogenic effect of nanoscale extracellular vesicles derived from human umbilical cord mesenchymal stem cells[J].*Biomed Mater Eng*,2017,28(Suppl 1):S75-79.DOI:10.3233/BME-171626.
- [47] Montemurro T,Viganò M,Ragni E,et al.Angiogenic and anti-inflammatory properties of mesenchymal stem cells from cord blood: soluble factors and extracellular vesicles for cell regeneration[J]. *Eur J Cell Biol*, 2016, 95(6/7): 228-238. DOI: 10.1016/j.ejcb.2016.04.003.
- [48] Van De Water L, Varney S, Tomasek JJ. Mechanoregulation of myofibroblast in wound contraction, scarring, and fibrosis: opportunities for new therapeutic intervention[J]. *Adv Wound Care (New Rochelle)*, 2013, 2(4): 122-141. DOI: 10.1089/wound.2012.0393.
- [49] Volk SW, Iqbal SA, Bayat A. Interactions of the extracellular matrix and progenitor cells in cutaneous wound healing[J]. *Adv*

- Wound Care (New Rochelle), 2013, 2(6): 261-272. DOI: 10.1089/wound.2012.0417.
- [50] Ferreira A, Cunha P, Carregal VM, et al. Extracellular vesicles from adipose-derived mesenchymal stem/stromal cells accelerate migration and activate AKT pathway in human keratinocytes and fibroblasts independently of miR-205 activity[J]. *Stem Cells Int*, 2017, 2017:9841035. DOI: 10.1155/2017/9841035.
- [51] Choi EW, Seo MK, Woo EY, et al. Exosomes from human adipose-derived stem cells promote proliferation and migration of skin fibroblasts[J]. *Exp Dermatol*, 2018, 27(10): 1170-1172. DOI: 10.1111/exd.13451.
- [52] Hu L, Wang J, Zhou X, et al. Exosomes derived from human adipose mesenchymal stem cells accelerates cutaneous wound healing via optimizing the characteristics of fibroblasts[J]. *Sci Rep*, 2016, 6:32993. DOI: 10.1038/srep32993.
- [53] McBride JD, Rodriguez-Menocal L, Guzman W, et al. Bone marrow mesenchymal stem cell-derived CD63(+) exosomes transport Wnt3a exteriorly and enhance dermal fibroblast proliferation, migration, and angiogenesis in vitro[J]. *Stem Cells Dev*, 2017, 26(19): 1384-1398. DOI: 10.1089/scd.2017.0087.
- [54] Kim YJ, Yoo SM, Park HH, et al. Exosomes derived from human umbilical cord blood mesenchymal stem cells stimulates rejuvenation of human skin[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2017, 493(2): 1102-1108. DOI: 10.1016/j.bbrc.2017.09.056.
- [55] Tooi M, Komaki M, Morioka C, et al. Placenta mesenchymal stem cell derived exosomes confer plasticity on fibroblasts[J]. *J Cell Biochem*, 2016, 117(7): 1658-1670. DOI: 10.1002/jcb.25459.
- [56] Zhang B, Wang M, Gong A, et al. HucMSC-exosome mediated-Wnt4 signaling is required for cutaneous wound healing[J]. *Stem Cells*, 2015, 33(7): 2158-2168. DOI: 10.1002/stem.1771.
- [57] MacLeod AS, Mansbridge JN. The innate immune system in acute and chronic wounds[J]. *Adv Wound Care (New Rochelle)*, 2016, 5(2): 65-78. DOI: 10.1089/wound.2014.0608.
- [58] Zhu Z, Ding J, Ma Z, et al. Systemic depletion of macrophages in the subacute phase of wound healing reduces hypertrophic scar formation[J]. *Wound Repair Regen*, 2016, 24(4): 644-656. DOI: 10.1111/wrr.12442.
- [59] Zhao B, Zhang Y, Han S, et al. Exosomes derived from human amniotic epithelial cells accelerate wound healing and inhibit scar formation[J]. *J Mol Histol*, 2017, 48(2): 121-132. DOI: 10.1007/s10735-017-9711-x.
- [60] Wang L, Hu L, Zhou X, et al. Exosomes secreted by human adipose mesenchymal stem cells promote scarless cutaneous repair by regulating extracellular matrix remodelling[J]. *Sci Rep*, 2017, 7(1): 13321. DOI: 10.1038/s41598-017-12919-x.
- [61] Pelizzo G, Avanzini MA, Icaro Cornaglia A, et al. Extracellular vesicles derived from mesenchymal cells: perspective treatment for cutaneous wound healing in pediatrics[J]. *Regen Med*, 2018, 13(4): 385-394. DOI: 10.2217/rme-2018-0001.
- [62] Riau AK, Ong HS, Yam G, et al. Sustained delivery system for stem cell-derived exosomes[J]. *Front Pharmacol*, 2019, 10: 1368. DOI: 10.3389/fphar.2019.01368.
- [63] Ma H, Zhou Q, Chang J, et al. Grape seed-inspired smart hydrogel scaffolds for melanoma therapy and wound healing[J]. *ACS Nano*, 2019, 13(4): 4302-4311. DOI: 10.1021/acsnano.8b09496.
- [64] Mao C, Xiang Y, Liu X, et al. Photo-Inspired antibacterial activity and wound healing acceleration by hydrogel embedded with Ag/Ag@AgCl/ZnO nanostructures[J]. *ACS Nano*, 2017, 11(9): 9010-9021. DOI: 10.1021/acsnano.7b03513.
- [65] Wang M, Wang C, Chen M, et al. Efficient angiogenesis-based diabetic wound healing/skin reconstruction through bioactive antibacterial adhesive ultraviolet shielding nanodressing with exosome release[J]. *ACS Nano*, 2019, 13(9): 10279-10293. DOI: 10.1021/acsnano.9b03656.
- [66] Shi Q, Qian Z, Liu D, et al. GMSC-derived exosomes combined with a chitosan/silk hydrogel sponge accelerates wound healing in a diabetic rat skin defect model[J]. *Front Physiol*, 2017, 8: 904. DOI: 10.3389/fphys.2017.00904.
- [67] Han C, Zhou J, Liu B, et al. Delivery of miR-675 by stem cell-derived exosomes encapsulated in silk fibroin hydrogel prevents aging-induced vascular dysfunction in mouse hindlimb[J]. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*, 2019, 99: 322-332. DOI: 10.1016/j.msec.2019.01.122.
- [68] Hu P, Yang Q, Wang Q, et al. Mesenchymal stromal cells-exosomes: a promising cell-free therapeutic tool for wound healing and cutaneous regeneration[J/OL]. *Burns Trauma*, 2019, 7: 38[2020-04-10]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25091427>. DOI: 10.1186/s41038-019-0178-8.
- [69] Akyurekli C, Le Y, Richardson RB, et al. A systematic review of preclinical studies on the therapeutic potential of mesenchymal stromal cell-derived microvesicles[J]. *Stem Cell Rev Rep*, 2015, 11(1): 150-160. DOI: 10.1007/s12015-014-9545-9.
- [70] Gimona M, Pachler K, Laner-Plamberger S, et al. Manufacturing of human extracellular vesicle-based therapeutics for clinical use[J]. *Int J Mol Sci*, 2017, 18(6): 1190. DOI: 10.3390/ijms18061190.
- [71] Haney MJ, Klyachko NL, Zhao Y, et al. Exosomes as drug delivery vehicles for Parkinson's disease therapy[J]. *J Control Release*, 2015, 207: 18-30. DOI: 10.1016/j.jconrel.2015.03.033.
- [72] Pascucci L, Coccè V, Bonomi A, et al. Paclitaxel is incorporated by mesenchymal stromal cells and released in exosomes that inhibit in vitro tumor growth: a new approach for drug delivery[J]. *J Control Release*, 2014, 192: 262-270. DOI: 10.1016/j.jconrel.2014.07.042.
- [73] Wahlgren J, De L Karlson T, Brissler M, et al. Plasma exosomes can deliver exogenous short interfering RNA to monocytes and lymphocytes[J]. *Nucleic Acids Res*, 2012, 40(17): e130. DOI: 10.1093/nar/gks463.
- [74] Hood JL. Post isolation modification of exosomes for nanomedicine applications[J]. *Nanomedicine (Lond)*, 2016, 11(13): 1745-1756. DOI: 10.2217/nnm-2016-0102.
- [75] Ohno S, Takanashi M, Sudo K, et al. Systemically injected exosomes targeted to EGFR deliver antitumor microRNA to breast cancer cells[J]. *Mol Ther*, 2013, 21(1): 185-191. DOI: 10.1038/mt.2012.180.

(收稿日期: 2020-04-10)