

# 间充质干细胞来源外泌体对视网膜新生血管影响的研究进展

杨晓英, 徐国兴

引用: 杨晓英, 徐国兴. 间充质干细胞来源外泌体对视网膜新生血管影响的研究进展. 国际眼科杂志 2020;20(6):974-976

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (No. 81770948)

作者单位: (350005) 中国福建省福州市, 福建医科大学附属第一医院眼科 福建省眼科研究所

作者简介: 杨晓英, 女, 眼科学硕士, 医师, 研究方向: 晶状体、视网膜疾病。

通讯作者: 徐国兴, 教授, 主任医师, 博士研究生导师, 研究方向: 晶状体、视网膜病. fjmuxgx@163.com

收稿日期: 2019-05-17 修回日期: 2020-05-08

## 摘要

视网膜新生血管形成是许多视网膜疾病的病理特征, 例如早产儿视网膜病变和糖尿病视网膜病变, 可导致严重的视力丧失甚至失明。抑制视网膜新生血管形成是治疗这些视网膜疾病的治疗策略。目前, 已存在几种抑制视网膜新生血管形成的治疗策略, 包括激光封闭、抑制血管内皮生长因子(VEGF)以及干细胞的移植等。随着干细胞研究的深入, 发现干细胞治疗尽管潜力极大, 但亦存在如移植细胞的低生存力、先天异质性等技术障碍, 目前研究发现来源于间充质干细胞(MSCs)的外泌体具有与MSCs相似的功能, 且尺寸小、易于通过生物膜, 为细胞治疗提供了一种新思路, 本文就外泌体对视网膜新生血管疾病的最新进展作一综述。

关键词: 视网膜新生血管; 间充质干细胞; 外泌体

DOI:10.3980/j.issn.1672-5123.2020.6.10

## Research progress on the effect of exosomes derived from mesenchymal stem cells on retinal neovascularization

Xiao-Ying Yang, Guo-Xing Xu

Foundation item: Natural Science Foundation of China (No. 81770948)

Fujian Institute of Ophthalmology; Department of Ophthalmology, the First Affiliated Hospital of Fujian Medical University, Fuzhou 350005, Fujian Province, China

Correspondence to: Guo - Xing Xu. Fujian Institute of Ophthalmology; Department of Ophthalmology, the First Affiliated Hospital of Fujian Medical University, Fuzhou 350005, Fujian Province, China. fjmuxgx@163.com

Received: 2019-05-17 Accepted: 2020-05-08

## Abstract

• Retinal neovascularization is a pathological feature of

many retinal diseases, such as retinopathy of prematurity and diabetic retinopathy, which can lead to severe vision loss or even blindness. Inhibition of retinal neovascularization is a therapeutic strategy for the treatment of these retinal diseases. At present, there are several therapeutic strategies for inhibiting retinal neovascularization, including laser blocking, inhibition of vascular endothelial growth factor (VEGF), and transplantation of stem cells. With the deepening of stem cell research, people find that although stem cell therapy has great potential, there are also technical obstacles such as low viability of transplanted cells and congenital heterogeneity. Current studies have found exosomes derived from mesenchymal stem cells (MSCs). They have similar functions as MSCs, and their sizes are small and easy to pass through biofilm, which provides a new idea for cell therapy. This paper reviews the recent progress of exosomes on retinal neovascular diseases.

• KEYWORDS: retinal neovascularization; mesenchymal stem cells; exosomes

Citation: Yang XY, Xu GX. Research progress on the effect of exosomes derived from mesenchymal stem cells on retinal neovascularization. *Guoji Yanke Zazhi (Int Eye Sci)* 2020;20(6):974-976

## 0 引言

视网膜新生血管疾病属于全球范围内视力丧失的常见疾病<sup>[1]</sup>, 目前视网膜血管疾病药物治疗的最新进展包括玻璃体内应用缓释类固醇治疗黄斑水肿和眼内注射血管内皮生长因子抗体及干细胞移植等, 以消退眼内新生血管形成。干细胞由于制备方便、可高效扩增、具有免疫调节和组织修复能力等优点, 逐渐成为一线临床治疗的潜在方案。干细胞治疗尽管潜力极大, 但也存在较多问题, 如移植细胞的低生存力、先天异质性等。最近有报道称, 来源于间充质干细胞(MSCs)的外泌体具有与MSCs相似的功能, 外泌体包裹的抗炎药物可以从鼻孔运输到大脑以治疗中枢神经系统(CNS)炎症性疾病<sup>[2]</sup>。以类似的方式, 眼外注射外泌体使它们从眼球下空间快速递送到脉络膜和视网膜中。因此, 眼外注射外泌体成为一种安全的给药途径, 为治疗视网膜新生血管疾病提供新的治疗思路<sup>[3]</sup>。

## 1 MSCs 衍生的外泌体

1.1 MSCs 衍生的外泌体概述 MSCs 是一群自我更新和分化的多能前体细胞, 在特定条件下具有分化为骨细胞、软骨细胞、脂肪细胞、神经细胞、肌细胞等的能力<sup>[4]</sup>。MSCs 可以常规从自体或同种异体组织中获得<sup>[5]</sup>。MSCs 不仅可以通过自我增殖和分化取代受损组织, 还可以通过

旁分泌调节作用,作为重要的微环境调节剂来改变受损组织的微环境。由于获得方便,免疫原性低,无伦理争议和可分泌营养因子等优点,被认为是治疗和移植的重要资源<sup>[6]</sup>。尽管具有如此潜在的治疗应用前景,但是仍面临一些技术障碍,如移植细胞的低生存力,先天异质性,与供体衰老有关的不明因素和潜在的致瘤性等<sup>[7]</sup>。目前,多项研究报告,来源于 MSCs 的外泌体具有与 MSCs 相似的功能,包括修复受损组织,抑制炎症反应和调节免疫反应等。外泌体是一种可从许多不同类型的细胞分离的直径约 100 (30~120)nm 的细胞外囊泡 (EV)<sup>[8]</sup>。EV 是由脂质双层包围的天然纳米颗粒,受微环境影响而释放。EV 将其膜信号或亲本细胞的内部内容物(包括核酸、脂质、线粒体和蛋白质)传递到靶细胞中,从而导致靶细胞发生的生理变化<sup>[9-10]</sup>。与 MSCs 相比,间充质干细胞衍生的外泌体 (MSCs-Exo) 具有稳定性好,易保存,无免疫原性,易于获取,转化方便等优点,由于尺寸较小,外泌体可以很容易地穿过生物屏障并进入靶器官<sup>[8]</sup>。因此,它为许多疾病的治疗提供了一种新方法。

## 1.2 MSCs 衍生的外泌体来源和组成

### 1.2.1 MSCs 衍生的外泌体的来源

外泌体最初是在 1983 年发现的,以前认为它只是浪费细胞。然而,研究人员发现,这种微小的膜囊泡中存在细胞的各种复杂成分。例如,一些具有特定功能的蛋白质和脂质组分分布在囊泡<sup>[11-12]</sup>的表面上。外泌体中的蛋白质可分为两类:第一种是广谱蛋白质,其与外泌体的生物起源和功能相关,例如抗原结合蛋白。第二种是特异性蛋白质,其呈现特定的细胞功能。具有不同来源的外泌体的生理功能是多种多样的。外泌体将重要的生物分子(如受体和配体)转运到靶细胞,并反过来触发这些生物分子的释放。外泌体作为微环境的重要组成部分,是由大多数细胞分泌的膜囊泡,直径为 40~150nm。在各种活细胞和细胞膜的多囊体融合后,外泌体以胞吐作用的形式释放到细胞外环境中<sup>[13-15]</sup>。

### 1.2.2 MSCs 衍生的外泌体的组成

研究表明,不同组织来源的 MSCs 有助于消除炎症反应和组织修复和再生,主要是通过细胞外囊泡依赖性旁分泌方式。细胞外囊泡可以基于直径细分为 3 类:直径在 40~100nm 之间的外泌体,直径在 100~1000nm 之间的微泡和直径在 500~1000nm 之间的凋亡小体。在许多情况下,“细胞外囊泡”被称为外泌体和微泡的组合。外泌体通过内体膜的向内出芽产生的小膜囊泡(30~100nm)通过将复杂的生物信息[包括 mRNA,微小 RNA (miRNA) 和可溶性蛋白质]转移到这些靶细胞中来调节受体细胞的功能<sup>[16]</sup>。载于外泌体或微泡中的蛋白质、脂质、核苷酸和其他成分可以被运输到受体细胞并影响各种细胞内信号传导<sup>[17]</sup>。MSCs-Exo 保留了其亲本 MSCs 的一些特征,如免疫系统调节,调节神经突向外生长,促进血管生成<sup>[18]</sup>,以及修复受损组织的能力。

## 2 MSCs 衍生的外泌体的功能

### 2.1 修复受损组织

先前的研究表明,不同来源的 MSCs,包括人脐带血、骨髓、胚胎和胎膜等,可用于组织修复。Ding 等<sup>[19]</sup>研究去铁胺刺激人骨髓间充质干细胞衍生的外泌体通过促进血管新生而促进创面愈合的机制,研究表明 MSCs 衍生的外泌体通过 PI3K/AKT 途径诱导血管化,促进糖尿病皮肤创伤动物模型的皮肤创伤恢复。去铁胺可

能导致外泌体被触发,以便在无细胞治疗应用中显示出增强的血管生成潜能。Kim 等<sup>[20]</sup>研究从人脐血间充质干细胞衍生的外泌体刺激人皮肤的再生机制,发现人脐血间充质干细胞衍生的外泌体具有多种与皮肤修复有关的生长因子。经局部处理后,能促进人皮肤 I 型胶原和弹性蛋白的产生,降低人皮肤中 MMP-1 的生成。体外结果显示,人脐血间充质干细胞衍生的外泌体集成在人真皮成纤维细胞 (HDFS) 中,从而促进 HDFS 细胞迁移和胶原合成,对人类皮肤的创面修复有重要意义。

### 2.2 抑制炎症反应

MSCs 衍生的外泌体不仅可促进血管生成,修复受损相关组织,还具有抗炎作用。Sun 等<sup>[21]</sup>研究人脐带血间充质干细胞衍生的外泌体通过减轻炎症反应促进脊髓损伤小鼠功能的恢复,通过制备了人脐带血间充质干细胞衍生的外泌体,对脊髓损伤小鼠行尾静脉注射。结果表明,来源于 huemsc 的外泌体能有效触发巨噬细胞从 m1 向 m2 表型的极化,并显著降低促炎细胞因子 TNF- $\alpha$ 、IL-6、IFN- $\gamma$ 、g-csf、mcp-1 和 mip-1 $\alpha$  水平,同时增加抗炎细胞因子水平,对脊髓损伤后的功能恢复有明显的促进作用。

### 2.3 调节免疫反应

外泌体通过使用多个来向所有类型的免疫细胞明显地向 T 淋巴细胞传递消极信息机制。例如,已经显示来自 MSCs 和肿瘤来源的外泌体可以抑制淋巴细胞的增殖。以前显示由乳腺癌释放的外泌体可直接抑制 CD4<sup>+</sup> 和 CD8<sup>+</sup>T 淋巴细胞<sup>[22]</sup>。类似地,来自人类脂肪组织的 MSCs 衍生的外泌体证明了这一点有可能减少 T 细胞增殖。另外由外泌体实施的机制是通过诱导免疫效应细胞中的细胞凋亡。微泡或外泌体已发现在其表面上表达 FASL 和 TRAIL 以包括淋巴细胞为靶向<sup>[23-25]</sup>。抑制炎症性细胞因子如 IFN- $\gamma$  和 IL-17 的产生是 MSCs 衍生的外泌体用于抑制免疫应答的另一种机制<sup>[26]</sup>。

### 2.4 外泌体在多种疾病中发挥着至关重要的作用

Ono 等<sup>[27]</sup>发现 miR-23b 在 BM2 细胞处理后上调 MSCs-Exo,从而通过抑制靶基因 MARCKS 诱导休眠。抑制的 MARCKS 最终促进了乳腺癌细胞的休眠。Huang 等<sup>[28]</sup>表明 MSCs-Exo 参与心脏和血管,发挥抗凋亡,心脏再生,抗心脏重塑,抗炎,新血管形成和抗血管重塑的作用。最近对在低氧,无血清条件下培养的人 MSCs 衍生的外泌体的全面蛋白质组学分析显示,这些外泌体表达涉及血管生成的多种因子,包括与核因子  $\kappa$ B (NF $\kappa$ B),血小板衍生生长因子相关的信号蛋白表皮生长因子 (EGF) 和成纤维细胞生长因子 (FGF) 等。此外,它被认为是 MSCs 移植治疗的一种新的潜在分子机制<sup>[29]</sup>。总之,外泌体和多种疾病之间存在密切关系。然而,视网膜新生血管疾病在外泌体的研究则相对有限。

### 2.5 外泌体在视网膜新生血管疾病的最新进展

Hajrasouliha 等<sup>[3]</sup>研究来自视网膜星形胶质细胞的外泌体抑制激光诱导的脉络膜新生血管的抗血管生成的机制,通过构建激光诱导的 CNV 模型,将外泌体注射入小鼠玻璃体腔内,发现来自视网膜星形胶质细胞的外泌体含有多种抑制激光诱导的脉络膜新生血管形成的抗血管生成成分。说明视网膜星形胶质细胞外泌体具有治疗脉络膜新生血管的临床应用潜力,可用作几种疾病的辅助疗法,包括渗出性年龄相关性黄斑变性 (ARMD),增殖性糖尿病性视网膜病和与肿瘤转移相关的血管生成等。He 等<sup>[8]</sup>通过从人脐带血间充质干细胞中成功分离外泌体,与 RPE 细胞共

培养,并构建暴露于蓝光下激光诱发视网膜损伤小鼠模型,于小鼠玻璃体内注射不同剂量外泌体,观察并比较它们在激光诱发视网膜损伤小鼠模型中的作用,发现 MSCs 衍生的外泌体通过下调 VEGF-A 改善 RPE 细胞中的蓝光刺激和激光诱导的视网膜损伤。推测 MSCs-Exo 可能是玻璃体内注射的最佳候选者,可能克服潜在干细胞移植治疗相关的障碍和风险,如长期病理分化、保存不良等。Moisseiev 等<sup>[30]</sup>通过成功构建 OIR 模型,于玻璃体腔内注射外泌体,发现通过低氧、无血清条件下从间充质干细胞分离的外泌体注射入 OIR 小鼠眼内能较好耐受,对视网膜缺血有保护作用,且无免疫及炎症反应发生。外泌体治疗后视网膜缺血程度和新生血管发展减少。说明外泌体可作为一种新的非细胞治疗方式。

### 3 展望

MSCs-Exo 具有免疫调节,调节神经轴突向外生长,促进血管生成以及修复受损组织等能力,且更加安全稳定,在视网膜新生血管疾病应用方面具有广阔前景。但外泌体的研究尚处于实验阶段,仍需在与人眼更加相似的大型动物眼内进行模拟,从而检测安全性及更好地理解 MSCs-Exo 作用,并且能够应用于临床之前时还需研究远期剂量问题。相信随着研究的深入,外泌体疗法会为视网膜新生血管疾病患者提供新的希望。

### 参考文献

- 1 Wang JD, An Y, Zhang JS, et al. Human bone marrow mesenchymal stem cells for retinal vascular injury. *Acta Ophthalmol* 2017; 95 (6): 453-461
- 2 Zhuang X, Xiang X, Grizzle W, et al. Treatment of brain inflammatory diseases by delivering exosome encapsulated anti-inflammatory drugs from the nasal region to the brain. *Mol Ther* 2011; 19: 1769-1779
- 3 Hajrasouliha AR, Jiang G, Lu QX, et al. Exosomes from Retinal Astrocytes Contain Antiangiogenic Components That Inhibit Laser-induced Choroidal Neovascularization. *J Biol Chem* 2013; 288: 58-67
- 4 Burge R, Dawson-hughes B, Solomon DH, et al. Incidence and economic burden of osteoporosis-related fractures in the United States, 2005-2025. *J Bone Miner Res* 2007; 22: 465-475
- 5 Alexande RM, Hu R, Runtsch MC, et al. Exosome-delivered microRNAs modulate the inflammatory response to endotoxin. *Nat Commun* 2015; 6: 7321
- 6 Jarmalavičiūtė A, Tunaitis V, Pivoraitė U, et al. Exosomes from dental pulp stem cells rescue human dopaminergic neurons from 6-hydroxy-dopamine-induced apoptosis. *Cytotherapy* 2015; 17(7): 932-939
- 7 Baldari S, Di Rocco G, Piccoli M, et al. Challenges and strategies for improving the regenerative effects of mesenchymal stromal cell-based therapies. *Int J Mol Sci* 2017; 18: 2087
- 8 He GH, Zhang W, Ma YX, et al. Mesenchymal stem cells-derived exosomes ameliorate blue light stimulation in retinal pigment epithelium cells and retinal laser injury by VEGF-dependent mechanism. *Int J Ophthalmol* 2018; 11(4): 559-566
- 9 Maas SLN, Breakefield XO, Weaver AM. Extracellular vesicles: Unique intercellular delivery vehicles. *Trends Cell Biol* 2017; 27: 172-188
- 10 Riazifar M, Pone EJ, Lötvall J, et al. Stem cell extracellular vesicles: Extended messages of regeneration. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2017; 57: 125-154
- 11 Jalabert A, Vial G, Guay C, et al. Exosome-like vesicles released from lipid-induced insulin-resistant muscles modulate gene expression and proliferation of beta recipient cells in mice. *Diabetologia* 2016; 59: 1049-1058

- 12 SaaRi H, Lazaro-ibanez E, Viitala T, et al. Microvesicle- and exosome-mediated drug delivery enhances the cytotoxicity of Paclitaxel in autologous prostate cancer cells. *J Control Release* 2015; 220: 727-737
- 13 Evguenieva-Hackenberg E, Hou L, Glaeser S, et al. Structure and function of the archaeal exosome. *Wiley Interdiscip Rev RNA* 2014; 5(5): 623-635
- 14 Kalra H, Adda CG, Liem M, et al. Comparative proteomics evaluation of plasma exosome isolation techniques and assessment of the stability of exosomes in normal human blood plasma. *Proteomics* 2013; 13(22): 3354-3364
- 15 Schneider C, Tollervey D. Threading the barrel of the RNA exosome. *Trends Biochem Sci* 2013; 38: 485-493
- 16 Wang D, Gao B, Yue J, et al. Exosomes from mesenchymal stem cells expressing miR-125b inhibit neointimal hyperplasia via myosin IIE. *J Cell Mol Med* 2019; 23(2): 1528-1540
- 17 史云燕, 沈俐, 高硕, 等. 人脐带间质干细胞来源的外泌体对大鼠心肌细胞缺血/再灌注损伤的作用. *江苏大学学报(医学版)* 2012; 22(4): 277-281
- 18 Zhang H, Liu X, Huang S, et al. Microvesicles Derived from Human Umbilical Cord Mesenchymal Stem Cells Stimulated by Hypoxia Promote Angiogenesis Both *In Vitro* and *In Vivo*. *Stem Dev* 2012; 21(18): 3289-3297
- 19 Ding J, Wang X, Chen B, et al. Exosomes Derived from Human Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells Stimulated by Deferoxamine Accelerate Cutaneous Wound Healing by Promoting Angiogenesis. *Biomed Res Int* 2019; 9742765
- 20 Kim YJ, Yoo SM, Park HH, et al. Exosomes derived from human umbilical cord blood mesenchymal stem cells stimulates rejuvenation of human skin. *Biochem Biophys Res Commun* 2017; 493(2): 1102-1108
- 21 Sun G, Li G, Li D, et al. hucMSC derived exosomes promote functional recovery in spinal cord injury mice via attenuating inflammation. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl* 2018; 89: 194-204
- 22 Wen SW, Sceneay J, Lima LG, et al. The biodistribution and immune suppressive effects of breast Cancer-derived exosomes. *Cancer Res* 2016; 76: 6816-6827
- 23 Andreola G, Rivoltini L, Castelli C, et al. Induction of lymphocyte apoptosis by tumor cell secretion of FasL-bearing microvesicles. *J Exp Med* 2002; 195: 1303-1316
- 24 Abusamra AJ, Zhong Z, Zheng X, et al. Tumor exosomes expressing Fas ligand mediate CD8+ T-cell apoptosis. *Blood Cells Mol Dis* 2005; 35: 169-173
- 25 Martínez-Lorenzo MJ, Anel A, Alava MA, et al. The human melanoma cell line MeJUSo secretes bioactive FasL and APO2L/TRAIL on the surface of microvesicles. Possible contribution to tumor Counterattack. *Exp Cell Res* 2004; 295: 315-329
- 26 Favaro E, Carpanetto A, Lamorte S, et al. Human mesenchymal stem cell-derived microvesicles modulate T cell response to islet antigen glutamic acid decarboxylase in patients with type 1 diabetes. *Diabetologia* 2014; 57: 1664-1673
- 27 Ono M, Kosaka N, Tominaga N, et al. Exosomes from bone marrow mesenchymal stem cells contain a microRNA that promotes dormancy in metastatic breast cancer cells. *Sci Signal* 2014; 7(332): ra63
- 28 Huang L, Ma W, Ma Y, et al. Exosomes in mesenchymal stem cells, a new therapeutic strategy for cardiovascular diseases? *Int J Biol Sci* 2015; 11: 238-245
- 29 Kim DH, MaRtin JT, Elliott DM, et al. Phenotypic stability, matrix elaboration and functional maturation of nucleus pulposus cells encapsulated in photocrosslinkable hyaluronic acid hydrogels. *Acta Biomater* 2015; 12: 21-29
- 30 Moisseiev E, Anderson JD, Oltjen SL, et al. Protective Effect of Intravitreal Administration of Exosomes Derived from Mesenchymal Stem Cells on Retinal Ischemia. *Curr Eye Res* 2017; 42(10): 1358-1367