

间充质干细胞外泌体中的RNA与蛋白质

罗超^{1,2} 黄磊^{1,2} 吴平平³ 费久旺^{1,2} 顾玉荣^{2*}

(¹南昌大学研究生院医学部, 南昌 330006; ²南昌大学第二附属医院骨科 南昌 330006;

³九江学院附属医院, 九江 332000)

摘要 间充质干细胞(mesenchymal stem cell, MSC)外泌体是MSC中的多泡小体与细胞膜融合时分泌到细胞外环境中的50~200 nm大小的细胞外囊泡。MSC外泌体含有TSG101、CD9和CD81等典型蛋白质与多种RNA。人们逐渐认识到外泌体是通过传递其蛋白质和RNA等内容物到受体细胞发挥作用的。因此, MSC外泌体的治疗潜能可能是因为它含有特殊的蛋白质或RNA。该文对外泌体蛋白质和RNA的作用机制进行探究, 并提出MSC外泌体很可能通过蛋白质而不是RNA发挥效应。

关键词 间充质干细胞; 外泌体; RNA; 蛋白质

RNA and Protein in Exosomes of Mesenchymal Stem Cell

LUO Chao^{1,2}, HUANG Lei^{1,2}, WU Pingping³, FEI Jiuwang^{1,2}, GU Yurong^{2*}

(¹Nanchang University Graduate School of Medicine, Nanchang 330006, China; ²Department of Orthopedics, The Second Affiliated Hospital of Nanchang University, Nanchang 330006, China; ³Affiliated Hospital of Jiujiang University, Jiujiang 332000, China)

Abstract Mesenchymal stem cell exosomes are 50-200 nm extracellular vesicles that are secreted into the extracellular environment when the multivesicular bodies in MSC fuse with the plasma membrane. MSC exosomes contain typical exosome-associated proteins such as TSG101, CD9, CD81 and carry a variety of RNAs. It has been gradually recognized that exosomes act by delivering their protein and RNA contents to recipient cells. Therefore, the therapeutic potential of MSC exosomes may be due to their specific protein or RNA content. In this paper, the mechanism of action of exosome protein and RNA was explored, and it was proposed that MSC exosome might exert its effect through protein rather than RNA.

Keywords mesenchymal stem cell; exosome; RNA; protein

MSC(mesenchymal stem cell)能从成人骨髓组织及脐带等组织中获取, 在动物模型中对许多疾病有治疗效果, 在干细胞再生医学领域应用广泛。最新研究表明, MSC外泌体在干细胞的治疗中有重要作用。外泌体是由细胞分泌的胞外囊泡的其中一种, 富含多种RNA和蛋白质^[1-2]。因此, 普遍认为MSC外泌体是通过蛋白质和RNA等内容物发挥作用的, 但具体机制目前并不清楚。本文就MSC外泌体是通过蛋白质或RNA发挥作用的研究进展作一综述。

1 MSC外泌体的临床应用和治疗潜能的发现

MSC是一类能够进行自我增殖及定向分化的多能干细胞。人们在探究MSC的作用机制时经常会观察到在进行MSC移植后出现与移植或MSC分化不相关的功能改善^[3-5]。TOMA等^[6]发现, 向心肌中移植MSC仅4天后就出现干细胞分化。但GNECCHI等^[7]也证实, 在移植MSC 72 h后心室功能就会出现改善, 早于MSC移植后分化为心肌细胞的时间。这些观察和研究都与移植MSC的“植入和分化”假说相矛盾。越来越多的人提出, MSC是通过其分泌物来减轻组织损伤并进行组织修复的^[8]。GNECCHI等^[7]与TIMMERS等^[9]分别于2006年和2008年证实, 在无

收稿日期: 2019-07-19 接受日期: 2019-09-16

*通讯作者。Tel: 13006211646, E-mail: guyurong1646@163.com

Received: July 19, 2019 Accepted: September 16, 2019

*Corresponding author. Tel: +86-13006211646, E-mail: guyurong1646@163.com

URL: <http://www.cjcb.org/arts.asp?id=5210>

干细胞参与下, MSC分泌物能够缩小急性心肌梗死小鼠的心肌梗死面积。这些研究提示, MSC分泌物在干细胞的治疗中有重要作用, 深入研究发现, 胞外囊泡是MSC分泌物中的重要成分^[10]。

外泌体是50~200 nm大小的胞外囊泡。研究表明, 外泌体膜与细胞膜类似, 膜上都含有丰富的信号分子与表面抗原, 但并不含细胞核或线粒体等细胞器。外泌体膜通常都含CD9、CD81、Alix和TSG101等蛋白质, 但由于细胞来源和细胞状态的不同, 外泌体也包含特定的蛋白质^[11]。外泌体最早被认为是细胞处理废物的垃圾桶^[12]。研究表明, 几乎所有的细胞类型都能分泌和摄取外泌体, 这是细胞的一种基本功能。因此, 外泌体具有普遍且重要的功能。

目前MSC外泌体是根据其尺寸或密度进行制备的, 但这些方法很难确保外泌体制剂的纯度。外泌体制剂可以是高度异质性制剂, 可能包含三种或者更多不同种的胞外囊泡群体^[13]。这些胞外囊泡可通过霍乱毒素B链(cholera toxin B chain, CTB)、膜联蛋白(annexin V, AV)和志贺毒素(Shiga toxin, ST)对膜脂结合配体的亲和力来区分, 这些配体分别与GM1神经节苷脂、磷脂酰丝氨酸和酰基鞘醇醇三己糖(或Gb3)结合。由于每一种配体均能够结合多种脂质分子, 因此这种配体-脂质结合可能只发生在局部脂质浓度高的位点, 并且这些脂质要足够接近配体才能实现多价结合。因此这些位点可能提示这些胞外囊泡的生物发生位点。

CTB在细胞膜和细胞质中的定位与脂筏中CTB结合GM1神经节苷脂的富集是一致的, 这是受体介导内吞作用和内体生物发生的主要场所, 因此这也是外泌体的生成部位。包括脉冲追踪在内的多个证据表明, 与CTB结合的胞外囊泡是外泌体^[14]。但是细胞质中的AV结合位点尚未确定。与CTB和CD81拥有众多的结合位点相反, AV与CD81或细胞膜结合的共同定位点很少。这也表明在健康细胞中, 结合AV的胞外囊泡不是外泌体。

因此, 迄今为止大多数MSC外泌体制剂都含有小型胞外囊泡的异源群体。在本文中, “MSC外泌体”这一术语是指由MSC分泌的50~200 nm的胞外囊泡。

2010年, 首次出现了有关MSC外泌体临床应用的描述^[15]。当使用高效液相色谱法对MSC的条件培养基内的微粒进行分析时发现其中含有大小均

一、流体力学半径为55~65 nm的微粒。这些颗粒都具有CD9、CD81、1.10~1.18 g/mL的悬浮密度和富含胆固醇的脂膜等明显的外泌体特征^[15-16]。研究表明, MSC外泌体对肝脏纤维化^[17]、肢体缺血性损伤^[18]、糖尿病引起的认知功能障碍^[19]等疾病都有治疗作用。这一系列的外泌体活性与MSC广泛的治疗效果相关联。由此提示, MSC的治疗效果很大程度上是通过外泌体来实现的。

2 MSC外泌体中的RNA及其作用机制

像大多数外泌体一样, MSC外泌体也富含RNA。但不同的是, MSC外泌体中没有检测到18s或28s RNA^[2,20]。研究表明, MSC外泌体中只鉴定到小部分的MSC miRNA, 这表明, miRNA的分泌是有选择性的^[16,18]。许多miRNA是pri-和pre-miRNAs等前体miRNA, 而不是成熟miRNA。

深度测序是目前无偏差分析DNA和RNA的最新技术, 测序发现MSC外泌体中的RNA是一种约为100个核苷酸的高度异源的RNA种类^[13]。实验观察到外泌体RNA大多数是核糖体RNA、Y RNA、snRNA和加工的转录物等, 而不是成熟miRNA。除了miRNA外, 大多数外泌体RNA与母体细胞的RNA片段一致, 并且不引起任何生物学功能。对MSC外泌体中的RNA进行深度测序时发现, miRNA只占2%~5%, 大部分RNA都是tRNA。

研究表明, 外泌体内的mRNA和microRNA能够传递给其他细胞, 并使受体细胞发生生物学反应, 这一研究结果掀起了外泌体RNA的研究热潮^[1-2]。进一步分析显示, 大多数外泌体的RNA长度在200~400个核苷酸^[15,22-26]。相对于平均长度约为2 314个核苷酸的人mRNA而言^[27], 外泌体中的RNA由于过短而无法携带蛋白质编码信息。并且有研究表明, MSC是通过效率更高的缝隙连接将miRNA转导到其他细胞中^[28]。因此, 越来越多的人认为, MSC外泌体是通过细胞间传递的miRNA来发挥MSC的治疗效果。

miRNA转变成pre-miRNA, 并且与RNA诱导沉默复合物(RNA-induced silencing complex, RISCs)结合时才具有生物功能^[29]。因此, 必须明确外泌体相关miRNA是pri-、pre-还是成熟miRNA。如果miRNA是成熟miRNA, 则应确定miRNA是否与RISCs相关。搜索ExoCarta和Vesiclepedia数据库(2018年1月17日访问)发现, 在外泌体或细胞外囊泡中一般检测不到

Dicer和Argonaute蛋白。有研究表明,大多数循环miRNA是非囊泡相关的核糖核酸蛋白复合物^[30],因此部分胞外囊泡相关的miRNA就更可能是非囊泡相关核糖核酸蛋白复合物,并且与外泌体和小型胞外囊泡共同纯化。总之,这些研究表明,外泌体或细胞外囊泡不携带完整的RISCs。

MSC外泌体中丰富的miRNA提示,可能存在使MSC分泌物发挥治疗作用的miRNA机制。正如KATSUDA和OCHIYA^[31]的综述所描述, MSC外泌体的miRNA参与了血管再生、免疫调节、抗细胞凋亡和抗纤维化等细胞活动。

为了确定MSC外泌体的miRNA在治疗过程中是否发挥作用,先决条件是miRNA必须存在一定的生物学浓度。CHEVILLET等^[32]曾描述在MSC外泌体中检测到超过100种miRNA,含有特异性miRNA的外泌体的概率是1:100。据估计,每个外泌体的特殊miRNA分子数量远远少于一个。因此,一个细胞想要摄取一个目的miRNA分子,那么它将不得不摄取至少100个外泌体。

分析表明,在充分考虑miRNA浓度、结构和诸如RISCs等辅助蛋白有效性的情况下,外泌体一般不能通过特定miRNA发挥作用。

3 MSC外泌体内的蛋白质与其作用机制

迄今为止,已经有数个团队发表过MSC外泌体的蛋白质组学分析,并鉴定出1 000多种蛋白质^[33-38]。蛋白质在生物学过程中的地位提示, MSC外泌体蛋白质组参与了细胞间交流、细胞结构、炎症和外泌体生物发生与发展等许多关键的生物学过程^[38]。再根据这些外泌体蛋白的功能分类发现,外泌体蛋白与MSC治疗心血管疾病、成骨不全、牙周炎和骨折等众多疾病的疗效一致^[39]。MSC外泌体中的蛋白质与miRNA一样也具有调节疾病发病机制或组织修复与再生的许多生物学过程的潜力。

3.1 MSC外泌体包含信号分子

MSC外泌体包含细胞因子、白细胞介素、趋化因子和生长因子等多种信号分子蛋白。MSC外泌体被证实能治疗心肌梗死^[15]。这一疗效正是通过血管内皮生长因子、肝细胞生长因子、成纤维细胞生长因子、神经调节蛋白等生长因子^[40-42]和集落刺激因子、白血病抑制因子等细胞因子^[43-44]发挥作用。这些均有助于减少组织纤维化、血管再生和祖细胞

聚集。

ANDERSON等^[33]应用液相色谱-质谱对人类骨髓间充质干细胞外泌体中的蛋白质进行分析,共鉴定出1 927个蛋白。当MSC暴露于缺血条件下,血小板衍生生长因子、表皮生长因子和FGF等血管生成相关因子在外泌体中的含量增加。此外, TNF- α 、TGF- β 、Wnt5、 β -catenin和delta-like 4等大量的信号通路蛋白也存在于外泌体内。

外泌体的蛋白质组学体现出细胞系特异性。细胞膜转运、细胞连接、细胞骨架和结构蛋白等细胞基本功能是通过蛋白质发挥作用的。细胞系间RNA的异质性差异导致核酸结合蛋白表现出很大的多样性。MSC的外泌体比免疫细胞含有更多的细胞外基质蛋白,这与细胞外基质是干细胞增殖和发挥功能的重要调控因子的研究结果一致^[45-46]。

因此,外泌体的蛋白组成不仅可以反映母体细胞的生理和病理状态,也可以随着细胞微环境的改变而发生变化。SALOMON等^[47]发现, MSC会根据自身所处氧气溶度改变分泌的外泌体蛋白质的成分。MSC暴露在高氧分压环境下会抑制细胞骨架信号传导蛋白和网格蛋白介导的内吞作用蛋白的表达。显然,外泌体中蛋白质组成是高度动态的,这有助于改善细胞外环境。

3.2 MSC外泌体包含酶

蛋白质组学研究表明, MSC外泌体不仅含有GAPDH、磷酸甘油酸激酶(phosphoglycerate kinase, PGK)、磷酸葡萄糖变位酶(phosphoglucosmutase, PGM)、丙酮酸激酶m2(pyruvate kinase m2, PKm2)和烯醇化酶(enolase, ENO)这5种酶^[48],还含有CD73和20s蛋白酶体等几种酶。CD73是将细胞外AMP脱磷酸化为腺苷,这是Ras/Raf/MAPK和PI3K/Akt的重要激活因子^[49]。MSC外泌体的成分可以将AMP脱磷酸化成腺苷和无机磷酸盐,也为CD73的存在提供了证据。

蛋白质发挥作用的条件与miRNA一致,要求在治疗剂量的外泌体中存在一定的蛋白质。蛋白质发挥作用的关键是在治疗剂量中具有足够的生物化学效能,这样才能引起相关的生化效应。

已有报道称,在MSC外泌体中的蛋白质参与下,外泌体缩小了小鼠心肌缺血/再灌注(ischemia/reperfusion, I/R)损伤^[50-51]的梗死面积。在I/R损伤期间,心脏组织经历了显著的蛋白质组学变化^[52]。脂

肪酸氧化、糖酵解和三羧酸循环中的关键限速酶都大幅度减少,而在缺血和再灌注长达120 min后促凋亡蛋白显著增加。这些蛋白质组学的变化与心肌I/R损伤中ATP生成较少和细胞凋亡增加相符。MSC外泌体对心肌I/R损伤中ATP生成的减少和细胞凋亡的增加都有抑制作用^[53]。当用寡霉素预处理细胞时,细胞的线粒体内ATP酶被抑制,但用MSC的外泌体干预后可增加ATP的生成^[54],这更加证实了这一理论。由于MSC外泌体中存在GAPDH、PGK、PGM、ENO和PKm2这5种酶,ATP生成减少得到明显改善。在MSC外泌体蛋白质中,PGK和PKm2酶的活性分别是 $3.6 \times 10^{-3} \text{ U}/\mu\text{g}$ 和 $5.5 \times 10^{-3} \text{ U}/\mu\text{g}$ ^[55]。因此,在1 μg 的MSC外泌体蛋白质中,PGK和PKm2两种糖酵解酶结合起来的酶活性是 $9.1 \times 10^{-3} \text{ U}$,并且每分钟能生成 $9.1 \times 10^{-3} \mu\text{mol}$ 的ATP。由于哺乳类动物组织中ATP浓度大约是2~6 $\mu\text{mol}/\text{g}$ ^[56],1 g组织含有约 10^8 个细胞^[57],1个细胞含有 2×10^{-8} ~ $6 \times 10^{-8} \mu\text{mol}$ 的ATP。因此,每分钟内1 μg 外泌体产生的ATP数量与 1.5×10^5 ~ 4.6×10^5 个细胞的生成量一致。此外,估计人类细胞每秒消耗 10^9 个ATP^[58]。由于1 μg MSC外泌体中的两种糖酵解酶能在每分钟内生成 $9.1 \times 10^{-3} \mu\text{mol}$ ATP,所以1 μg MSC外泌体每秒可以生成 $0.15 \times 10^{-3} \mu\text{mol}$ 或 $0.15 \times 10^{-9} \text{ mol}$ ATP;1 μg 外泌体生成的ATP可以满足 $(6.02 \times 10^{23} \times 0.15 \times 10^{-9} \div 10^9) \approx 1 \times 10^5$ 个细胞活动1 s的需求量。

4 miRNA与蛋白质的MOA比较

MSC外泌体内的miRNA和蛋白质在引发生物学相关活性的能力进行比较时,生物学上重要的miRNA显然不存在正确的构型或浓度。因为MSC外泌体中通常不存在RISC的成分^[18],所以外泌体中成熟miRNA不可能在RISCs上。另一方面,在典型的外泌体剂量中没有足够的pre-miRNA来引起生物学相关反应。与miRNA不同,治疗剂量中的MSC外泌体蛋白质具有引起糖酵解等生物学相关反应的能力。因此,外泌体更可能是通过蛋白质发挥作用的。然而,我们应该注意到,很大程度上,酶的催化活性引起了生物学相关反应,而结构蛋白可能不会引起类似的生物反应。

5 结论

MSC外泌体中的miRNA和蛋白质在生物学上

都具有影响疾病或损伤相关过程的能力,因此MSC外泌体在发挥治疗作用时必须考虑到它们各自的作用,而不仅仅只考虑到外泌体的存在。本文讨论的关键因素包括在治疗剂量下的外泌体中,miRNA和蛋白质引起生物学相关活性的潜能。综上考虑,蛋白质可能是MSC外泌体发挥治疗活性的主要因素。

本文为外泌体制剂的制备提供了一种有效监测思路,通过检测外泌体内蛋白质的活性监控外泌体制剂的有效性,有助于外泌体在临床应用过程中选择合适的计量。

由于外泌体的成分还未被完全掌握,所以目前的研究和临床应用之间仍然存在很大差距。因此,外泌体内容物对生物活性的影响,以及我们如何获取治疗性的MSC外泌体仍需进一步深入研究。

参考文献 (References)

- [1] FRASER K, JO A, GIEDT J, et al. Characterization of single microvesicles in plasma from glioblastoma patients [J]. *Neuro Oncol*, 2019, 21(5): 606-15.
- [2] WILSON C M, NAVES T, AL AKHRASS H, et al. A new role under sortilin's belt in cancer [J]. *Commun Integr Biol*, 2016, 9(1): e1130192.
- [3] FERRAND J, NOEL D, LEHOURS P, et al. Human bone marrow-derived stem cells acquire epithelial characteristics through fusion with gastrointestinal epithelial cells [J]. *PLoS One*, 2011, 6(5): e19569.
- [4] SPEES J L, OLSON S D, YLOSTALO J, et al. Differentiation, cell fusion, and nuclear fusion during *ex vivo* repair of epithelium by human adult stem cells from bone marrow stroma [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, 100(5): 2397-402.
- [5] VASSILOPOULOS G, WANG P R, RUSSELL D W. Transplanted bone marrow regenerates liver by cell fusion [J]. *Nature*, 2003, 422(6934): 901-4.
- [6] TOMA C, PITTENGER M F, CAHILL K S, et al. Human mesenchymal stem cells differentiate to a cardiomyocyte phenotype in the adult murine heart [J]. *Circulation*, 2002, 105(1): 93-8.
- [7] GNECCHI M, HE H, NOISEUX N, et al. Evidence supporting paracrine hypothesis for Akt-modified mesenchymal stem cell-mediated cardiac protection and functional improvement [J]. *Faseb J*, 2006, 20(6): 661-9.
- [8] HALIM N S, AIZAT W M, YAHAYA B H. The effect of mesenchymal stem cell-secreted factors on airway epithelial repair [J]. *Regen Med*, 2019, 14(1): 15-31.
- [9] TIMMERS L, LIM S K, ARSLAN F, et al. Reduction of myocardial infarct size by human mesenchymal stem cell conditioned medium [J]. *Stem Cell Res*, 2007, 1(2): 129-37.
- [10] GIEBEL B, KORDELAS L, BORGER V. Clinical potential of mesenchymal stem/stromal cell-derived extracellular vesicles [J]. *Stem Cell Investig*, 2017, 4: 84.
- [11] SIMPSON R J, JENSEN S S, LIM J W. Proteomic profiling of exosomes: current perspectives [J]. *Proteomics*, 2008, 8(19): 4083-

- 99.
- [12] PAN B T, JOHNSTONE R M. Fate of the transferrin receptor during maturation of sheep reticulocytes *in vitro*: selective externalization of the receptor [J]. *Cell*, 1983, 33(3): 967-78.
- [13] LAI R C, TAN S S, YEO R W, et al. MSC secretes at least 3 EV types each with a unique permutation of membrane lipid, protein and RNA [J]. *J Extracell Vesicles*, 2016, 5: 29828.
- [14] TAN S S, YIN Y, LEE T, et al. Therapeutic MSC exosomes are derived from lipid raft microdomains in the plasma membrane [J]. *J Extracell Vesicles*, 2013, doi: 10.3402/jev.v2i0.22614.
- [15] LAI R C, ARSLAN F, LEE M M, et al. Exosome secreted by MSC reduces myocardial ischemia/reperfusion injury [J]. *Stem Cell Res*, 2010, 4(3): 214-22.
- [16] CHEN T S, LAI R C, LEE M M, et al. Mesenchymal stem cell secretes microparticles enriched in pre-microRNAs [J]. *Nucleic Acids Res*, 2010, 38(1): 215-24.
- [17] MA J, ZHAO Y, SUN L, et al. Exosomes derived from Akt-modified human umbilical cord mesenchymal stem cells improve cardiac regeneration and promote angiogenesis via activating platelet-derived growth factor D [J]. *Stem Cells Transl Med*, 2017, 6(1): 51-9.
- [18] ZHU Y, WANG Y, ZHAO B, et al. Comparison of exosomes secreted by induced pluripotent stem cell-derived mesenchymal stem cells and synovial membrane-derived mesenchymal stem cells for the treatment of osteoarthritis [J]. *Stem Cell Res Ther*, 2017, 8(1): 64.
- [19] NAKANO M, NAGAISHI K, KONARI N, et al. Bone marrow-derived mesenchymal stem cells improve diabetes-induced cognitive impairment by exosome transfer into damaged neurons and astrocytes [J]. *Sci Rep*, 2016, 6: 24805.
- [20] SMALHEISER N R. Exosomal transfer of proteins and RNAs at synapses in the nervous system [J]. *Biol Direct*, 2007, 2: 35.
- [21] BAGLIO S R, ROOIJERS K, KOPPERS-LALIC D, et al. Human bone marrow- and adipose-mesenchymal stem cells secrete exosomes enriched in distinctive miRNA and tRNA species [J]. *Stem Cell Res Ther*, 2015, 6: 127.
- [22] KESIMER M, SCULL M, BRIGHTON B, et al. Characterization of exosome-like vesicles released from human tracheobronchial ciliated epithelium: a possible role in innate defense [J]. *Faseb J*, 2009, 23(6): 1858-68.
- [23] KOSAKA N, IGUCHI H, YOSHIOKA Y, et al. Secretory mechanisms and intercellular transfer of microRNAs in living cells [J]. *J Biol Chem*, 2010, 285(23): 17442-52.
- [24] NOLTE-T HOEN E N, BUERMANS H P, WAASDORP M, et al. Deep sequencing of RNA from immune cell-derived vesicles uncovers the selective incorporation of small non-coding RNA biotypes with potential regulatory functions [J]. *Nucleic Acids Res*, 2012, 40(18): 9272-85.
- [25] JENJAROENPUN P, KREMENSKA Y, NAIR V M, et al. Characterization of RNA in exosomes secreted by human breast cancer cell lines using next-generation sequencing [J]. *PeerJ*, 2013, 1: e201.
- [26] ENDERLE D, SPIEL A, COTICCHIA C M, et al. Characterization of RNA from exosomes and other extracellular vesicles isolated by a novel spin column-based method [J]. *PLoS One*, 2015, 10(8): e0136133.
- [27] OTA T, SUZUKI Y, NISHIKAWA T, et al. Complete sequencing and characterization of 21,243 full-length human cDNAs [J]. *Nat Genet*, 2004, 36(1): 40-5.
- [28] PATEL S A, DAVE M A, BLISS S A, et al. Treg/Th17 polarization by distinct subsets of breast cancer cells is dictated by the interaction with mesenchymal stem cells [J]. *J Cancer Stem Cell Res*, 2014, doi: 10.14343/JCSCR.2014.2e1003.
- [29] KIM Y, KIM V N. MicroRNA factory: RISC assembly from precursor microRNAs [J]. *Mol Cell*, 2012, 46(4): 384-6.
- [30] DE ROSA S, INDOLFI C. Circulating microRNAs as biomarkers in cardiovascular diseases [J]. *Exp Suppl*, 2015, 106: 139-49.
- [31] KATSUDA T, OCHIYA T. Molecular signatures of mesenchymal stem cell-derived extracellular vesicle-mediated tissue repair [J]. *Stem Cell Res Ther*, 2015, 6: 212.
- [32] CHEVILLET J R, KANG Q, RUF I K, et al. Quantitative and stoichiometric analysis of the microRNA content of exosomes [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2014, 111(41): 14888-93.
- [33] ANDERSON J D, JOHANSSON H J, GRAHAM C S, et al. Comprehensive proteomic analysis of mesenchymal stem cell exosomes reveals modulation of angiogenesis via nuclear factor-kappaB signaling [J]. *Stem Cells*, 2016, 34(3): 601-13.
- [34] TOFIÑO-VIAN M, GUILLEN I, CAZ M D, et al. FRI0014 Antioxidant role of microvesicles from adipose tissue-derived mesenchymal stem cells in human osteoarthritic chondrocytes [M]. 2017.
- [35] LAI R C, YEO R W, TAN K H, et al. Mesenchymal stem cell exosome ameliorates reperfusion injury through proteomic complementation [J]. *Regen Med*, 2013, 8(2): 197-209.
- [36] COLLINO F, POMATTO M, BRUNO S, et al. Exosome and microvesicle-enriched fractions isolated from mesenchymal stem cells by gradient separation showed different molecular signatures and functions on renal tubular epithelial cells [J]. *Stem Cell Rev Rep*, 2017, 13(2): 226-43.
- [37] TAN S S, CHEN T S, TAN K H, et al. Chapter 2-an overview of the proteomic and miRNA cargo in MSC-derived exosomes [M]// TANG Y, DAWN B. *Mesenchymal Stem Cell Derived Exosomes*. Boston; Academic Press. 2015: 21-36.
- [38] LAI R C, TAN S S, TEH B J, et al. Proteolytic potential of the MSC exosome proteome: implications for an exosome-mediated delivery of therapeutic proteasome [J]. *Int J Proteomics*, 2012, 2012: 971907.
- [39] CASADEI A, EPIS R, FERRONI L, et al. Adipose tissue regeneration: a state of the art [J]. *J Biomed Biotechnol*, 2012, 2012: 462543.
- [40] FORMIGA F R, PELACHO B, GARBAYO E, et al. Controlled delivery of fibroblast growth factor-1 and neuregulin-1 from biodegradable microparticles promotes cardiac repair in a rat myocardial infarction model through activation of endogenous regeneration [J]. *J Control Release*, 2014, 173: 132-9.
- [41] GU X, LIU X, XU D, et al. Cardiac functional improvement in rats with myocardial infarction by up-regulating cardiac myosin light chain kinase with neuregulin [J]. *Cardiovasc Res*, 2010, 88(2): 334-43.
- [42] PALMEN M, DAEMEN M J, DE WINDT L J, et al. Fibroblast growth factor-1 improves cardiac functional recovery and enhances cell survival after ischemia and reperfusion: a fibroblast growth factor receptor, protein kinase C, and tyrosine kinase-dependent mechanism [J]. *J Am Coll Cardiol*, 2004, 44(5): 1113-23.
- [43] OKAZAKI T, EBIHARA S, ASADA M, et al. Macrophage colo-

- ny-stimulating factor improves cardiac function after ischemic injury by inducing vascular endothelial growth factor production and survival of cardiomyocytes [J]. *Am J Pathol*, 2007, 171(4): 1093-103.
- [44] ZGHEIB C, ZOUEIN F, KURDI M, et al. Chronic treatment of mice with leukemia inhibitory factor does not cause adverse cardiac remodeling but improves heart function [J]. *European Cytokine Network*, 2012, 23(4): 191-7.
- [45] BONNANS C, CHOU J, WERB Z. Remodelling the extracellular matrix in development and disease [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2014, 15(12): 786-801.
- [46] GATTAZZO F, URCIUOLO A, BONALDO P. Extracellular matrix: a dynamic microenvironment for stem cell niche [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2014, 1840(8): 2506-19.
- [47] SALOMON C, RYAN J, SOBREVIA L, et al. Exosomal signaling during hypoxia mediates microvascular endothelial cell migration and vasculogenesis [J]. *PLoS One*, 2013, 8(7): e68451.
- [48] LAI R C, CHEN T S, LIM S K. Mesenchymal stem cell exosome: a novel stem cell-based therapy for cardiovascular disease [J]. *Regen Med*, 2011, 6(4): 481-92.
- [49] STEELMAN L S, CHAPPELL W H, ABRAMS S L, et al. Roles of the Raf/MEK/ERK and PI3K/PTEN/Akt/mTOR pathways in controlling growth and sensitivity to therapy-implications for cancer and aging [J]. *Aging (Albany NY)*, 2011, 3(3): 192-222.
- [50] FEVRIER B, RAPOSO G. Exosomes: endosomal-derived vesicles shipping extracellular messages [J]. *Curr Opin Cell Biol*, 2004, 16(4): 415-21.
- [51] LAI R C, ARSLAN F, TAN S S, et al. Derivation and characterization of human fetal MSC: an alternative cell source for large-scale production of cardioprotective microparticles [J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2010, 48(6): 1215-24.
- [52] LI X, REN Y, SOROKIN V, et al. Quantitative profiling of the rat heart myoblast secretome reveals differential responses to hypoxia and re-oxygenation stress [J]. *J Proteomics*, 2014, 98: 138-49.
- [53] ARSLAN F, LAI R C, SMEETS M B, 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 [J]. *Stem Cell Res*, 2013, 10(3): 301-12.
- [54] DENG H, SUN C, SUN Y, et al. Lipid, Protein, and MicroRNA composition within mesenchymal stem cell-derived exosomes [J]. *Cell Reprogram*, 2018, 20(3): 178-86.
- [55] LAI R C, YEO R, TAN S S, et al. Mesenchymal stem cell exosomes: the future MSC-based therapy [M]? In: *Mesenchymal Stem Cell Therapy*, New York: Humana Press, 2013, 39-62.
- [56] BEIS I, NEWSHOLME E A. The contents of adenine nucleotides, phosphagens and some glycolytic intermediates in resting muscles from vertebrates and invertebrates [J]. *Biochem J*, 1975, 152(1): 23-32.
- [57] DEL MONTE U. Does the cell number 10(9) still really fit one gram of tumor tissue? [J]. *Cell Cycle*, 2009, 8(3): 505-6.
- [58] FLAMHOLZ A, PHILLIPS R, MILO R. The quantified cell [J]. *Mol Biol Cell*, 2014, 25(22): 3497-500.