

外泌体在伤口愈合中的作用

陈凤娇¹ 吕佳荟¹ 左朝艳¹ 杨影¹ 黄金炜¹ 陆莹² 丁洁^{1*}

(¹贵州大学生命科学学院/农业生物工程研究院, 山地植物资源保护与保护种质创新教育部重点实验室, 山地生态与农业生物工程协同创新中心, 贵阳 550025; ²贵州中医药大学基础医学院解剖学教研室, 贵阳 550025)

摘要 伤口愈合是一个复杂协调的过程, 受到多种内源性和外源性失衡的影响, 细胞间通讯对于伤口细胞发育和伤口微环境稳态的维持是必要的。外泌体是近年来因在许多生物过程中的调节功能而受到特别关注的细胞外囊泡, 外泌体几乎可以从任何细胞中分离出来, 其参与细胞间通讯, 并参与正常和病理生物学过程。外泌体的集合或组成有助于创周的细胞通讯, 富含多种脂质和蛋白的外泌体介导凝血、炎症和血管生成等伤口愈合阶段, 调节机体特异性免疫反应, 因此, 外泌体可以帮助组织重构完整性。该文综述了外泌体的结构和功能, 及其参与伤口有效愈合各个阶段中的分子动态, 评估了可能加速伤口愈合进程的因素和潜在的方式, 阐明了外泌体及其内容物在不同细胞和不同信号通路中的作用。

关键词 外泌体; 伤口愈合; 细胞增殖; 炎症反应; 血管再生

The Role of Exosomes in Wound Healing

CHEN Fengjiao¹, LÜ Jiahui¹, ZUO Zhaoyan¹, YANG Ying¹, HUANG Jinwei¹, LU Ying², DING Jie^{1*}

(¹Key Laboratory of Plant Resource Conservation and Germplasm Innovation in Mountainous Region (Ministry of Education), Collaborative Innovation Center for Mountain Ecology & Agro-Bioengineering (CICMEAB), College of Life Sciences/Institute of Agro-bioengineering, Guizhou University, Guiyang 550025, China; ²Department of Anatomy, School of Basic Medicine, Guizhou University of Traditional Chinese Medicine, Guiyang 550025, China)

Abstract Wound healing is a complex and coordinated process affected by multiple endogenous and exogenous imbalances. Intercellular communication is necessary for wound cell development and maintenance of wound microenvironment homeostasis. Exosomes are extracellular vesicles that have received special attention for their regulatory functions in many biological processes in recent years, which can be isolated from almost any cell, participate in intercellular communication, and participate in normal and pathobiological mechanisms. The collection or composition of exosomes contributes to cell communication around wound. Exosomes rich in lipids and proteins mediate the stages of wound healing such as coagulation, inflammation and angiogenesis to regulate specific immune responses of the body. Therefore, exosomes can help to reconstruct the integrity of tissues. This paper reviews the structure and function of exosomes and their molecular dynamics involved in various stages of effective wound healing, in order to evaluate the factors and potential ways that exosomes may accelerate the process of wound healing, and to clarify the role of exosomes and their contents in different cells and different signaling pathways.

Keywords exosomes; wound healing; cell proliferation; inflammatory response; angiogenesis

收稿日期: 2021-12-29 接受日期: 2022-02-17

贵州省科技计划项目(批准号: 黔科合基础-ZK (2021) 一般108)、贵州省教育厅青年科技人才成长项目(批准号: 黔教合KY字 (2017) 113)、国家自然科学基金(批准号: 81960838)和贵州省研究生科研基金(批准号: 黔教合YJSCXJH (2020) 080)资助的课题

*通讯作者。Tel: 18085108128, E-mail: 47734092@qq.com

Received: December 29, 2021 Accepted: February 17, 2022

This work was supported by the Guizhou Province Science and Technology Planning Project (Grant No.Qianke He Foundation-ZK (2021) General 108), the Talent Growth Project of Guizhou Education Department (Grant No.Qianjiao He Foundation-KY (2017) 113), the National Natural Science Foundation of China (Grant No.81960838), and the Guizhou Province Graduate Research Fund (Grant No.YJSCXJH (2020) 080)

*Corresponding author. Tel: +86-18085108128, E-mail: 47734092@qq.com

伤口愈合是机体细胞和介质发生一系列连续复杂相互作用的过程。伤口愈合中组织再生的主要目的是有效地重塑新的健康组织,减少瘢痕形成。若伤口组织不能及时恢复,可能会造成愈合延迟。长期的慢性伤口会引发感染或器官障碍等并发症^[1-2],这给患者、护理人员和社会带来极大的负担,如何提高伤口愈合效率成为亟需解决的难题。伤口愈合依赖于恢复皮肤皮下组织一系列有序的细胞发育和完整的生化反应,因此,有效识别伤口愈合相关的细胞标志物可为精准的靶向治疗提供思路。

外泌体(exosomes)是细胞主动向胞外分泌的纳米级膜性囊泡^[3],被公认是原核生物和真核生物中细胞间通讯的有效载体,可通过体液(母乳、血液、尿液、唾液、羊水和血清等)在附近细胞和遥远组织细胞之间运输活性物质^[4],参与调控受损组织的信号转导、蛋白表达、细胞通讯和组织再生等过程。外泌体被证实为细胞间通讯的媒介^[5],且其在伤口愈合全阶段的生物学效应中发挥重要作用^[6]。作为伤口治疗信号传播者,外泌体通过靶标特异的方式在伤口微环境中参与细胞间的通讯,调控机体多种生理病理的发生和发展。本文概述了外泌体的结构、形成过程、生物学功能及运输机制,重点阐述外泌体作为信号递送系统在炎症反应、血管生成、细胞增殖和角质层形成中的最新研究进展和临床发现,探索外泌体作为伤口“治愈信使”的前景和面临的挑战,旨在为大面积创伤的生物治疗提供新的理论基础。

1 外泌体的生物学特性

1.1 外泌体的结构和形成

外泌体的直径在30~150 nm之间,具有由鞘磷脂(sphingomyelin)、神经节苷脂GM2和GM3、磷脂酰丝氨酸(phosphatidylserine)、甘油二酸酯(diglyceride)、甘油磷脂(glycerol phosphatide)、聚甘油磷脂(polyglycerolipid)、磷脂酰乙醇胺(phosphatidylethanolamine)和高含量的胆固醇组成的脂双层膜^[7-9],鞘磷脂和GM3决定了外泌体膜的刚性,使其在外环境中表现出稳定性,而磷脂酰丝氨酸通过不同类型的磷脂转运酶(phospholipid translocases)在外泌体的质膜上表达,参与对接外部蛋白质,允许外泌体的信号传导和融合到质膜。外泌体的内容物是丰富的生物小分子,主要包括转运蛋白(transportprotein)、热休克蛋白(heat shock protein)、四跨膜蛋白(tetranembrane protein)、活性酶(active enzyme)、脂类、mRNA、miRNA、细胞因子(cytokines)和转录因子(transcription factor)等^[10],其中,CD9、CD63、CD81、CD82、flotillin、肿瘤易感基因101(tumor susceptibility gene 101, TSG101)、凋亡连接基因2相互作用蛋白X(apoptosis-linked gene 2-interacting protein X, Alix)和RAB等蛋白为外泌体标记物^[11](图1),这是外泌体区别于其他细胞外囊泡的一大特征,这些蛋白和相关脂质的相对表达水平很大程度上取决于来源的细胞类型,它们可能在不同的环境条件下发生变化。在不同的体液中,球状的外形可以使外泌体在生物发

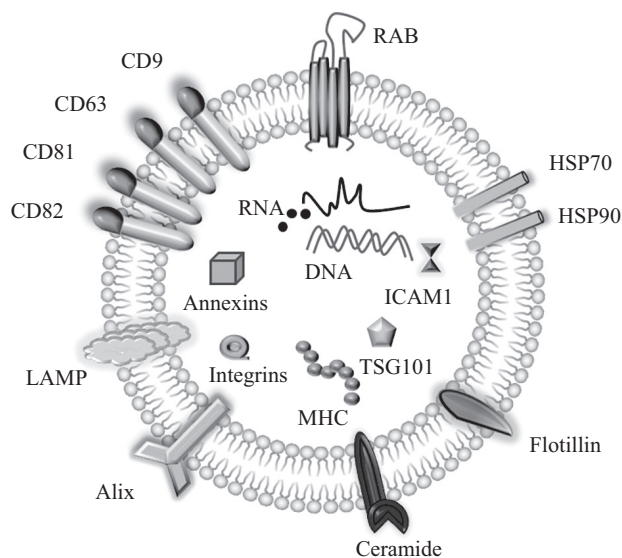


图1 外泌体的结构

Fig.1 The structure of exosome

生过程中快速完成运输、识别和内化。

外泌体的生物发生过程包括形成、成熟和释放三个步骤^[12]: 胞外的脂质、小分子和代谢物等成分与细胞膜上的蛋白质一起通过质膜脂筏域的内吞方式(endocytosis), 形成胞内吞小体或内早期核内体(early-sorting endosome, ESE), 同时, 胞内的反式高尔基体与内质网共同协助早期核内体的形成; 内吞体在胞内发育为晚期核内体(late-sorting endosome, LSE), 并在TSG101的刺激下, 小的微域通过内体分选复合体(endosomal sorting complexes required for transport, ESCRT)诱导向内出芽积累形成包含腔内囊泡(intraluminal vesicles, ILVs)的多囊体(multivesicular body, MVB); 此时, 晚期核内体完成向多囊体的转化, 这种转化伴随着一个精密的“货物分拣”过程, 富含3'-UTR的mRNA等可溶性分子被招募到ILVs中, 随后对这些可溶性分子进行泛素化修饰, 然后整合成受体细胞所需的蛋白^[3]; 这些多囊体通过微管和微丝等胞内网络运输至细胞膜内侧; 最后, 多囊体与溶酶体融合后被降解或与细胞质膜融合, 释放出腔内小囊泡, 即外泌体^[13](图2)。

1.2 外泌体的生理和临床意义

外泌体中多种内容物的合成和分拣受复杂的基因网络的调控, 是一个高度精确而非随机的过程, 其参与了正常的生物学过程和许多常见疾病(肾

脏疾病、类风湿性关节炎、股骨头坏死、肝再生、骨质疏松等)的发展。随着对外泌体所含功能性蛋白、mRNA及miRNA等成分的研究, 外泌体在体内信号转导中的作用也逐渐被认识, 外泌体的传导可减少凋亡细胞数量和降低病理学损伤程度以保护神经^[14], 这种保护机制在治疗阿尔茨海默病、败血症、亨廷顿病和肌萎缩性侧索硬化症等疾病方面也起重要的作用^[15]。同样地, 在其他疾病[例如心肌梗死^[16]和人类免疫缺陷病毒(HIV)^[17]]的发病机制研究中也观察到外泌体的参与。此外, 外泌体在肿瘤诊断^[18]、迁移生长^[19]、免疫抗原呈递、组织损伤修复^[20]等方面的作用也不可忽视。

外泌体的生物学功能和异质性取决于其来源组织和来源细胞的种类及其状态^[12], 外泌体的功能性成分通过与受体细胞特异性结合可向创伤组织传递各种信息, 如表1所示, 不同的内容物在机体中具有不同的功能。

研究表明, 外泌体在伤口修复中的凝血、凋亡、侵袭、转移、炎症、血管生成、内皮化、免疫反应和细胞间信号转导等多个阶段中发挥重要作用^[4,21-23]。外泌体所包含的蛋白或RNA等内含物可转移到受损组织表面, 通过受体-配体相互作用诱导信号转导, 或通过内吞作用和/或吞噬作用被内化, 继而与靶细胞的膜融合, 进而调节伤口愈合的整个过程。在众

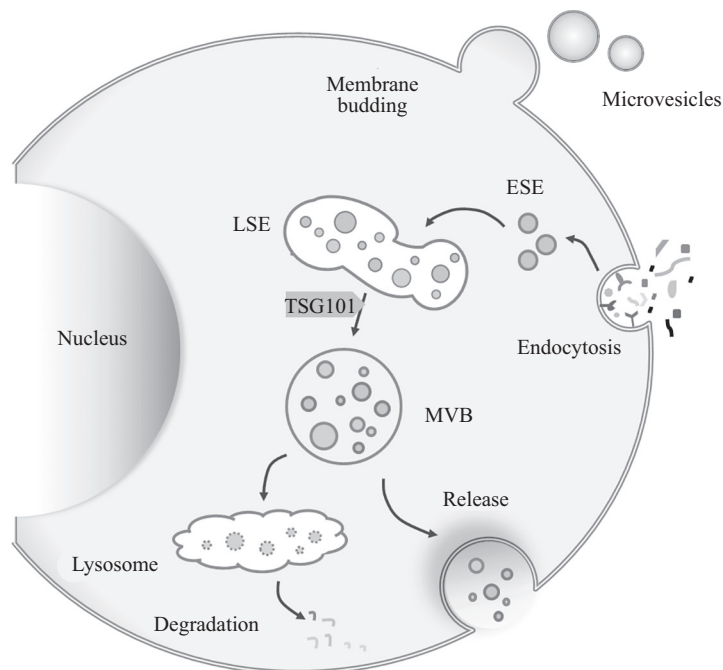


图2 外泌体的生物发生过程
Fig.2 The production process of exosome

表1 不同来源的外泌体及其内容物的生理或临床意义

Table 1 Physiological or clinical significance of exosomes and components from different sources

组织/细胞源 Origin of cell/tissue	主要内容物 Main components	生理/临床意义 Physiological or clinical significance
Mesenchymal stem cell	miR-132	Enhanced tubular formation
	miR-210, miR-126, miR-132, miR-21, miR-125a	Increased angiogenesis
	miR-191	Regulated cell cycle and cell proliferation
	miR-6087	Promoted endothelial cell differentiation
	miR-223	Regulated macrophage polarization and wound inflammation
Adipose-derived stem cell	miR-21, miR-222, miR-let7a, IGF-1	Increased neuronal remyelination process, increased hacat cell migration and proliferation
	miR-126, miR-30d-5p	Inhibited microglial activation and ischemic stroke-induced inflammation
	Cyclin ki67	Stimulated proliferation of Schwann cells
	miR-423-5p	Promoted proliferation and migration of endothelial cells, accelerated angiogenesis
	miR-128-3p	Reduced endothelial cell apoptosis and accelerated wound healing
	PDGFAA	Increased collagen and elastin expression
	miR-34a	Inhibited fibroblast proliferation
Liver tumor stem cell	LncRNA H19	Stimulated angiogenesis by upregulating endothelial VEGFR1 expression
Human umbilical vein endothelial cell	miR-132	Promoted formation of new blood vessels, maintained normal function of heart
Human kidney cancer stem cell	CD105	Promoted angiogenesis and tissue remodeling
Trophocyte	EMMPRIN	
Retinal pigment epithelium	VEGF	
Activated T cell	Fasl, Trail	Prevented potential autoimmune damage
B cell	CD63, CD81, CD82, CD53, CD37	Marked plasma membrane and ESE
Enterocyte	ISG15, ISG56, Mx2, Anti-HIV miRNA	Presenting antigens in response to inflammation
Mouse corneal epithelial cell	CD63, LTBP1	Induced myofibroblast transformation
HIV virus	CD9, CD81, IL-3, IL-4, IL-8, IL-17	Stimulated cell proliferation, migration and invasion
	miR-155, miR-223, miR-29a	Promoted inflammation
Amniotic epithelial cell	CD9, HSP 70, Nanog	
Monocyte and macrophage	CCR5, CXCR4	Stimulated cells lacking co-receptors, increasing the number of susceptible cells
M2 macrophage	CCL22, CCL24, MFG-E8	Converted M1 macrophages to M2 macrophages
	IL4, CXCL12, bFGF	Promoted angiogenesis and re-epithelialization
Antigen-presenting cell	Histocompatibilty complex	Stimulated or weakened immune response
Dendritic cell		Activated T and B cells, modulated
Breast milk	miR-181a, miR-155	Immune responses
Neutrophil	Olfactory protein 4	Immunomodulatory effects on keratinocytes
Vascular smooth muscle cell	TGFβ1, Fibronectin, HSPG2, Integrinα5, αV, ANXA2, Vesicle protein	Maintained vascular homeostasis by mediating VSMC-EC adhesion
Peripheral blood	miRNA-150-5p	Inhibited keratinocyte proliferation and inflammation
Melanoma	HIF1-a	Increased VEGF expression, induced angiogenesis and expression of GM-CSF and TNF-a
Urine	CD63, TSG101, DMBT1	Enhanced angiogenic activity of endothelial cells
Seminal fluid	Anti-virus mRNA	Promoted HIV transcriptional silencing
Tick saliva	CD63, HSP70	Delayed skin inflammation and cell migration
Serum	miR-483-3-3p	Pro-inflammatory, fibroblast proliferation, shortened wound healing time

多疾病的治疗中,外泌体在伤口愈合中的作用尤其突出。

2 外泌体在伤口愈合中的作用

伤口愈合一直是困扰病患和医学研究者的难题,伤口微环境稳态的评估和管理极其复杂^[24-25]。在伤口愈合的过程中,胞间通讯和细胞-基质之间的相互作用至关重要,细胞间信号转导是由细胞因子、神经肽、抗炎因子、生长因子、趋化因子和基质金属蛋白酶介导的,通过IL、TNF- α 、TGF- β 、VEGF、MMP、CCL等关键因子,可启动炎症细胞浸润、血管内皮细胞再生、成纤维细胞生成、胶原沉积、上皮细胞增殖和迁移、间质细胞死亡、角化细胞增殖和收缩蛋白产生等多个阶段,进而使得这些细胞谱系和组织协同修复缺失的细胞结构和组织层。需要注意的是,胞间信号一旦出现中断或延迟,可能会导致伤口愈合受阻,引起严重的创伤并发症,如细菌感染^[26]、溃疡、凝血功能障碍^[27]、周围神经损伤^[28]及肢体功能障碍等,因此,有效地干预伤口愈合中的信号传递是有必要的。

研究发现,外泌体参与调控创周细胞信号转导,不同细胞来源的外泌体促进创伤处炎症反应、成纤维细胞的增殖和迁移、微血管再生、角质层形成等愈合阶段的发生发展^[29]。在这些过程中,外泌体参与细胞间多种信号通路,如Wnt/ β -连环蛋白(Wnt/ β -catenin)、PI3K/Akt、NF- κ B、HIF α /VEGF等,它们的激活或抑制可联通或干扰细胞内外效应。当外泌体与靶细胞融合时,其携带的生物活性分子被转移以调控基因表达、细胞迁移、组织完整性和物质更新代谢等,进而调节皮肤创面组织的愈合进程^[30]。

2.1 巨噬细胞和中性粒细胞的炎症反应

巨噬细胞(macrophages)和中性粒细胞(neutrophils)在伤口炎症、增生和血管生成过程中扮演重要的角色。巨噬细胞分为三种类型:M0型即未激活状态,M1型具有促炎抗菌的作用,M2型可抗炎、沉积胶原、促修复和活化旁路,其中,M1型和M2型巨噬细胞在不同的伤口愈合阶段可以互相转化,这种转化有助于伤口从炎症期顺利转移到增殖期。中性粒细胞是触发机体先天免疫反应最丰富的细胞类型^[31],可以被迅速诱导至创伤或感染部位吞噬并杀死入侵伤口的微生物。外泌体可调节巨噬细胞极化和中性粒细胞增殖,同时上调炎症因子(inflammatory factor)

表达,刺激伤口发生炎症反应。

外泌体可诱导伤口区域的巨噬细胞极化,来自MSCs外泌体的miR-223通过靶向pknx1以增强M2巨噬细胞的极化,而无外泌体的MSCs引起伤口部位M2巨噬细胞数量较少,使得炎症细胞无法有效地转位至创面部位,导致伤口修复延迟^[32]。此外,有研究表明,M1型巨噬细胞可以向M2巨噬细胞转化,体外重编程靶向巨噬细胞的精氨酸酶(arginase,M2标记)和iNOS(M1标记)后,在伤口部位可实现M1直接转化为M2^[33],以促进血管生成、再上皮化和胶原沉积。因此,可以通过不同的细胞因子激活不同表型的巨噬细胞,针对性地进行伤口治疗。M2巨噬细胞源性外泌体可通过miR-23a-3p/PTEN/PI3K/Akt增加M2巨噬细胞百分比,降低M1巨噬细胞百分比^[34],适当的表型转换为不同疾病的有效炎症发生创造了可能性。研究人员在治疗溃疡性结肠炎(ulcerative colitis, UC)模型时发现,BMSC源的外泌体先募集M1型巨噬细胞于伤口处释放促炎因子TNF- α 、IL-6和IL-12,随后,M2型巨噬细胞标志物CD163表达上调,M2巨噬细胞通过分泌IL-10、IL-4、IL-1RA等抗炎细胞因子,上调主要的趋化因子配体,如CCL17、CCL22和CCL24表达^[33,35],同时,降低炎症信号的外泌体通过miR-590-3p可从巨噬细胞转移到上皮细胞,激活YAP/ β -catenin调节的转录过程,加速伤口再上皮化^[36]。需要注意的是,上调的IL-8会延迟外泌体介导的皮肤炎症和细胞迁移,导致组织损伤程度增加^[37]。因此,信号分子存在促进组织修复和延缓愈合两种可能,获得良好的伤口护理效果的前提是找到最佳的信号组合调控模式。

大量的创伤模型均发现外泌体具有正向疗效,随着研究深入,该疗效在皮肤病临床治疗中得到证实。广泛性脓疱性银屑病(generalized pustular psoriasis, GPP)是一种罕见且严重的炎症性皮肤病^[38],GPP患者的中性粒细胞比正常人能分泌更多的外泌体,外泌体随后迅速被角质形成细胞内化,通过激活NF- κ B/MAPK信号通路以增加IL-1 β 、IL-18、IL-36G、CXC等炎症分子的表达,使皮肤能够进行自主修复。外泌体通过HMGB1/TLR4/NF- κ B信号级联诱导中性粒细胞自噬,延长中性粒细胞的存活时间并上调中性粒细胞中IL-1 β 、TNF- α 和OSM等炎症因子的表达^[39]。此外,研究发现来自中性粒细胞的外泌体具有强大的促凝作用,外泌体可以减少中性粒细胞的凋亡并增强其吞噬能力,这有助于伤口结

痂而避免长时间的炎症反应^[40]。总体而言,外泌体能改善炎性细胞的功能以提高免疫力,适度的炎症反应有助于疾病出现转好的迹象,而过度的炎症反应将会损害到伤口周围的健康组织,长期的炎症反应也将延迟伤口愈合。因此,外泌体在不同的条件下能调节伤口微环境的炎症,加快伤口愈合进程,但是,进一步确认相关外泌体的实际功能是有必要的,并需要对其分子特征和调控网络进行详细分析。

2.2 成纤维细胞增殖

当组织从炎症阶段过渡到增殖阶段时,伤口的结缔组织重塑和纤维化形成全面启动。成纤维细胞是创面纤维化中主要的靶细胞和效应细胞,具有合成胶原纤维(collagenous fiber)、弹性纤维(elastic fiber)、网状纤维(reticular fiber)、肌动蛋白及胞外基质等机能。

成纤维细胞通过产生和重塑基质蛋白以维持组织多细胞稳态。研究表明,来源于脐带间充质干细胞(umbilical cord mesenchymal stem cell, UMSC)的外泌体miRNA可抑制成纤维细胞的分化,并通过调控TGF β 2/SMAD2信号通路使miR-21-5p、miR-125-5p、miR-23-3p和miR-145-5p级联靶向性地增强成纤维细胞的迁移与增殖能力,这种增殖效应也会涉及同组织的多种细胞类型,血清外泌体促进烫伤组织的成纤维细胞增殖和HaCaT人类永生表皮细胞迁移^[41],双重作用加速了伤口愈合;小鼠角膜上皮细胞衍生的外泌体在体外与角质形成细胞(keratinocytes, KCs)融合并诱导肌成纤维细胞的转化^[42],外泌体从上皮基底膜破裂后进入底层中参与基质的再生,多层次的靶向信号有助于组织重塑,而当角膜病变后,小鼠模型损伤组织的外泌体却延迟了伤口愈合和感觉神经再生,故相同来源的外泌体在不同微环境下可能有不同的调控作用^[43]。此外,细胞间转移分子的运动离不开信号通路的辅助,脂肪源性干细胞(adipose derived stem cell, ADSC)分泌的外泌体激活PI3K/Akt信号通路后,成纤维细胞中I型胶原(Col1)、III型胶原(Col3)、弹性蛋白、TIMP-1的mRNA和蛋白表达水平升高,成纤维细胞增殖和迁移速率加快,同时也优化了创面胶原沉积^[44]。在保证外泌体的纯度和剂量的前提下,利用其靶向修复伤口可以实现多层多信号的愈合途径。

增生性瘢痕是组织损伤后常见的并发症,外泌体在创面愈合的不同时期呈现出不同的胶原修复以

抑制瘢痕增生。在创面愈合早期,外泌体能促进I、III型胶原的分泌,加快创面愈合速度;而在愈合后期,外泌体能抑制瘢痕成纤维细胞的增殖,并促进其凋亡。研究人员发现,ADSC-Exos被成纤维细胞摄取并内化,促进早期胶原合成的同时抑制后期增生性瘢痕成纤维细胞增殖,这种效应可由过表达miR-34a和下调TGF- β /SMAD得以放大^[45]。此外,ADSC-Exos可被招募至小鼠皮肤创面区域,组织学分析表明,早期I、III型胶原蛋白的产生和分泌明显增多,而在创伤愈合晚期,外泌体通过抑制胶原蛋白表达以减少瘢痕形成和过度纤维化^[46]。综上所述,具有靶向性的外泌体是一种促进成纤维细胞增殖和抑制瘢痕增生的可靠介质。

2.3 微血管生成

外泌体在血管发生和血管生成中发挥重要作用。血管的形成能促进创伤处与周围组织建立联系,及时输送营养物质、灌注氧气和清除代谢有毒物质。

外泌体被认为是血管再生的潜在治疗工具。据报道,外泌体转移的miR-125a可增加CD34⁺尖端细胞(endothelial tip cell)的比例,同时,miR-125a抑制DLL-4/Notch以调节内皮尖端细胞和干细胞规格之间的平衡,从而增加内皮细胞数量和血管分支密度以促进血管发生^[47]。外泌体的正负调控作用将上游小分子传递至下游再生信号通路末端以提高表皮微血管的再生率。人脐静脉血管内皮细胞(human umbilical vein vessel endothelial cell, HUVEC)的外泌体在激活PKA信号后,内源性VEGF的表达上调,同时下游促血管生成基因*Angpt1*和*Flk1*富集到创伤处^[48],以促进内皮细胞的迁移和侵袭。类似地,人脐带间充质干细胞(human umbilical cord mesenchymal stem cell, HUCMSC)外泌体激活内皮细胞的细胞周期蛋白(Cyclin) D3和 β -catenin,随后Wnt4表达上调使得伤口处血管内壁重组加速^[49];角膜上皮细胞衍生的外泌体可诱导内皮细胞增殖和肉芽组织再生^[50],由此可见,外泌体可在调节血管内皮细胞功能和维持血管生成平衡中发挥作用。

外泌体可协调血管形成和成骨分化同步进行以促进多层组织修复。BMSC来源的外泌体通过激活BMP-2/SMAD1/RUNX2和HIF-1 α /VEGF信号通路实现骨不连骨折愈合,这种促骨修复效应在类似的研究中也有发现,HUCMSC-Exos的分泌可增强血管内皮生长因子(VEGF)和缺氧诱导因子-1 α (HIF-1 α)的表

达, 激活PI3K/Akt和MAPK/ERK1/2信号通路, 提升内皮细胞的增殖能力和迁移活性, 使得大鼠股骨骨折模型的再上皮化和骨愈合过程得以加速^[51-52], 同时, HUCMSC-Exos诱导体内血小板-内皮细胞黏附分子(CD31)和伤口处Ang2蛋白表达上调^[53], 从而提高烧伤创面愈合率, 因此, 外泌体可能有助于严重创伤患者的皮肤血管化和骨愈合同步进行。值得注意的是, 外泌体的内皮化作用会受到化学或生物因素的影响, YU^[54]证明了BMSC衍生的外泌体经阿托伐他汀(atorvastatin, ATV)预处理后可通过Akt/eNOS途径上调miR-221-3p表达水平, 以促进HUVEC的血管生成能力, 适当的药物协助可能增大外泌体治疗伤口的效果。然而, 外泌体也可能影响HUVEC的血管生成效果, 沉默miRNA可减轻外泌体对缺血性坏死组织再生的抑制作用^[55]。综上, 含血管生成活性因子的外泌体释放可促进血管内皮细胞的增殖和迁移, 适当的外源性信号刺激可促使受损组织处血管再生过程的发生, 深入探索信号互作机制可能是一种潜在的加速伤口愈合的策略。

2.4 角质层形成

角质形成细胞是角质层的重要组成部分, 角质形成细胞通过分泌脂质以形成表皮水屏障, 不同来源的外泌体内含物能够介导不同的信号通路, 产生炎性因子, 靶向角质形成细胞的增殖和迁移。在皮肤组织恢复过程中, miR-21促进角质形成细胞迁移并促进其上皮化^[56], 研究者发现, 在创面发生后, ADSC-Exos迅速上调miR-21的表达水平, 该趋化因子通过PI3K/Akt信号通路影响MMP-2和TIMP-1蛋白的表达, 以促进角质层的恢复和再生^[57]。ADSC-Exos促进角质层形成的相关信号转导在类似研究中也发现, 它通过与RNA结合蛋白PUM2互作, 激活PUM2介导的AuroraA/NF- κ B通路, 诱导角质形成细胞的炎症反应, 并且通过调控体内MMP-1和MMP-3的表达来促进角质细胞的增殖和迁移^[58]。外泌体对角质层形成细胞的正向调控作用给予表皮更多治疗空间, 目前尚处于临床实践阶段。特应性皮炎患者外周血外泌体可促进人角质形成细胞中活化(K16)、分化(K10、IVL)、炎症(TSLP、IL-25、IL-33、CXCL2)因子等的表达, 抑制角质形成细胞凋亡, 值得关注的是, 当特应性皮炎患者外周血外泌体miRNA-150-5p的表达下调时, 其介导的HMGA2/STAT3信号通路靶向角质形成细胞的活化、增殖和

炎症, 以促进角质层的形成, 从而起到加速重塑组织的作用^[59], 这可能将成为治疗皮肤表层疾病的新方向。

3 总结与展望

外泌体的识别、结构和功能特征有助于了解活细胞中的基因加工途径, 外泌体介导免疫治疗与细胞治疗相似, 因为它们都是自然产生的生物应答反应。然而, 与细胞靶向治疗相比, 外泌体具有许多优点: 易于制备、存储、运输和管理; 在模型治疗中具有高效的靶向效率; 能穿透毛细血管的细胞间隙抵达基底组织, 且没有免疫排斥和肿瘤发生的风险; 可以加速伤口愈合和减少疤痕形成。

伤口愈合是一个重要的医学问题, 其各个阶段是精确且程序化的, 涉及各种胞内途径(图3)如凝血级联、炎症反应、新血管生成、结缔组织再生、角质层形成和免疫调节等多个过程, 不同的组织和细胞谱系会协同作用以修复缺失的细胞结构和组织层。外泌体可以在细胞间传递生物活性分子, 当外泌体与靶细胞融合时, 这些生物活性分子与“适配器”蛋白结合后启动一系列伤口愈合反应: 炎症细胞浸润、内皮细胞增殖和迁移、基质细胞再生、角质细胞增殖、肌成纤维细胞生成和胶原沉积等, 需要注意的是, 适配和互作的过程在不同伤口类型中存在发生时间和效应力差异。

外泌体作为新一代无细胞疗法利器, 其有效的传递有助于伤口愈合各阶段的发生发展, 包括促进血管生成、激活伤口愈合途径、促进生长因子的分泌和胶原蛋白的合成。外泌体的包装和产生过程具有高度的可塑性, 这很大程度上受环境因素的影响, 进一步研究外泌体参与不同疾病或同一疾病不同病理阶段的受损部位微环境, 可以揭示其调控组织修复的多种信号分子和信号互作机制, 为无细胞治疗在再生医学中的应用提供充足的理论基础。然而, 外泌体也可能会传递负调控信号, 如含miR-27a的外泌体抑制皮肤角质形成细胞成纤维细胞迁移, 该伤口愈合进程受阻^[60], 外泌体的释放并非都有临床意义, 综合性考虑外泌体在伤口微环境中的干预效果是需要探索的。

近年来外泌体在伤口治疗领域取得了一些成果, 但这些治疗相关的临床转化仍然存在较大的挑战, 首先, 外泌体大量分离的方法不成熟, 信号体纯化程序

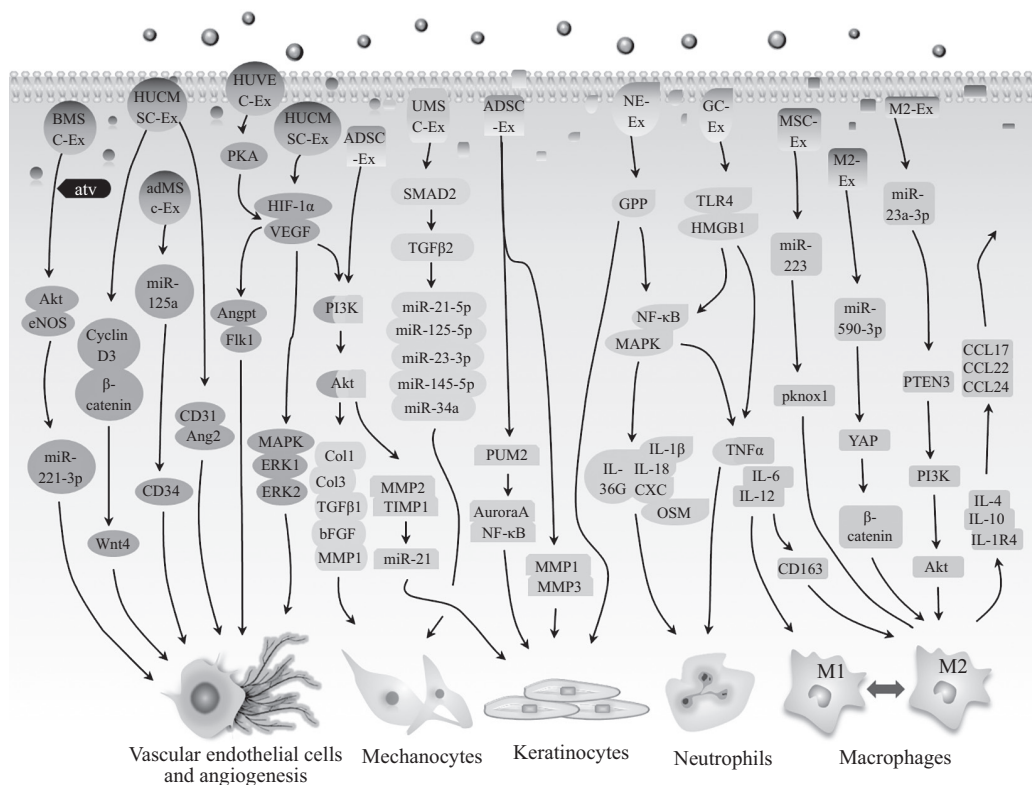


图3 外泌体参与调控伤口愈合相关的胞内途径

Fig.3 Exosomes were involved in regulating intracellular pathways related to wound healing

缺乏标准化, 分子组成及表征了解不完全, 故其功能系谱有待完善; 其次, 未证实不同内容物如何被选择进入多囊体, 在作为伤口治疗剂时, 各种内容物的精准分泌及有效配比尚不清楚; 外泌体被列为新的诊断生物标志物和治疗靶点, 但在复杂伤口微环境中, 其旁分泌引起的非靶向效应可能具有毒副作用, 外泌体也可能加速负调控因子转移; 此外, 外泌体可以通过静脉注射到伤口部位或周围用于治疗慢性伤口, 这为靶向给药和有效慢性创伤的个性化治疗打开了大门, 未来需要开发并兼顾内容物的有效剂量和生物活性, 使其成为一个多功能的有效信息输送系统。因此, 亟需通过深入研究外泌体的生物学特征及其在细胞通讯中的具体调节机制, 才能进一步将外泌体应用于伤口治疗性干预和其他疾病治疗。

—致谢

珠海市金湾区三灶镇中心小学陆婷婷老师对本文图片处理提供悉心指导, 在此表示由衷的感谢。

参考文献 (References)

[1] JONES R E, FOSTER D S, HU M S, et al. Wound healing and

fibrosis: current stem cell therapies [J]. *Transfusion*, 2019, 59(1): 884-92.

[2] ROY S, SANTRA S, DAS A, et al. Staphylococcus aureus bio-film infection compromises wound healing by causing deficiencies in granulation tissue collagen [J]. *Ann Surg*, 2020, 271(6): 1174-85.

[3] DONOSO-QUEZADA J, AYALA-MAR S, GONZALEZ-VAL-DEZ J. The role of lipids in exosome biology and intercellular communication: function, analytics and applications [J]. *Traffic*, 2021, 22(7): 204-20.

[4] GURUNATHAN S, KANG M H, JEYARAJ M, et al. Review of the isolation, characterization, biological function, and multifarious therapeutic approaches of exosomes [J]. *Cells*, 2019, doi: c10.3390/cells8040307.

[5] RAPOSO G, STOOORVOGEL W. Extracellular vesicles: exosomes, microvesicles, and friends [J]. *J Cell Biol*, 2013, 200(4): 373-83.

[6] SHI R F, JIN Y P, HU W W, et al. Exosomes derived from mmu_circ_0000250-modified adipose-derived mesenchymal stem cells promote wound healing in diabetic mice by inducing miR-128-3p/SIRT1-mediated autophagy [J]. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2020, 318(5): 848-56.

[7] SHAHIN H I, RADNAA E, TANTENGCO O A G, et al. Microvesicles and exosomes released by amnion epithelial cells under oxidative stress cause inflammatory changes in uterine cells [J]. *Biol Reprod*, 2021, 105(2): 464-80.

[8] RECORD M, CARAYON K, POIROT M, et al. Exosomes as new vesicular lipid transporters involved in cell-cell communi-

- cation and various pathophysiologicals [J]. *Bba-mol Cell Biol L*, 2014, 1841(1): 108-20.
- [9] GREY M, DUNNING C J, GASPAR R, et al. Acceleration of alpha-synuclein aggregation by exosomes [J]. *J Biol Chem*, 2015, 290(5): 2969-82.
- [10] THERY C, BOUSSAC M, VERON P, et al. Proteomic analysis of dendritic cell-derived exosomes: a secreted subcellular compartment distinct from apoptotic vesicles [J]. *J Immunol*, 2001, 166(12): 7309-18.
- [11] VLASSOV A V, MAGDALENO S, SETTERQUIST R, et al. Exosomes: current knowledge of their composition, biological functions, and diagnostic and therapeutic potentials [J]. *Bba-gen Subjects*, 2012, 1820(7): 940-8.
- [12] KALLURI R, LEBLEU V S. The biology, function, and biomedical applications of exosomes [J]. *Science*, 2020, doi: 10.1126/science.aau6977.
- [13] GURUNATHAN S, KANG M H, KIM J H. A comprehensive review on factors influences biogenesis, functions, therapeutic and clinical implications of exosomes [J]. *Int J Nanomed*, 2021, 16: 1281-312.
- [14] JIA Y J, YANG J W, LU T S, et al. Repair of spinal cord injury in rats via exosomes from bone mesenchymal stem cells requires sonic hedgehog [J]. *Regen Ther*, 2021, 18: 309-15.
- [15] YERRAPRAGADA S M, BIHL J C. Role of exosomes in mediating the cross-talk between adipose tissue and the brain [J]. *Neuromol Med*, 2021, doi: 10.1007/s12017-021-08664-0.
- [16] LAKSONO S, SETIANTO B, PRAWARA A S, et al. Highlighting exosomes' function in cardiovascular diseases [J]. *Curr Cardiol Rev*, 2021, doi: 10.2174/1573403X17666210204153526.
- [17] CHEN J, LI C, LI R, et al. Exosomes in HIV infection [J]. *Curr Opin HIV AIDS*, 2021, 16(5): 262-70.
- [18] TAUCHI Y, TANAKA H, KUMAMOTO K, et al. Tumor-associated macrophages induce capillary morphogenesis of lymphatic endothelial cells derived from human gastric cancer [J]. *Cancer Sci*, 2016, 107(8): 1101-9.
- [19] HOOD J L, ROMAN S S, WICKLINE S A. Exosomes released by melanoma cells prepare sentinel lymph nodes for tumor metastasis [J]. *Cancer Res*, 2011, 71(11): 3792-801.
- [20] CHEN C Y, RAO S S, REN L, et al. Exosomal DMBT1 from human urine-derived stem cells facilitates diabetic wound repair by promoting angiogenesis [J]. *Theranostics*, 2018, 8(6): 1607-23.
- [21] ZHANG C L, LU X X, HU J J, et al. Bovine milk exosomes alleviate cardiac fibrosis via enhancing angiogenesis *in vivo* and *in vitro* [J]. *J Cardiovasc Transl Res*, 2021, doi: 10.1007/s12265-021-10174-0.
- [22] QIU H, SHI S S, WANG S C, et al. Proteomic profiling exosomes from vascular smooth muscle cell [J]. *Proteom Clin Appl*, 2018, doi: 10.1002/prea.201700097.
- [23] ZHANG X, YUAN C, BAI J, et al. The function of tumor-derived exosomes [J]. *J Buon*, 2019, 24(3): 897-904.
- [24] EMING S A, MARTIN P, TOMIC-CANIC M. Wound repair and regeneration: mechanisms, signaling, and translation [J]. *Sci Transl Med*, 2014, doi: 10.1126/scitranslmed.3009337.
- [25] VU N B, NGUYEN H T, PALUMBO R, et al. Stem cell-derived exosomes for wound healing: current status and promising directions [J]. *Minerva Med*, 2021, 112(3): 384-400.
- [26] ZHAO Y, DU X C, JIANG L B, et al. Glucose oxidase-loaded antimicrobial peptide hydrogels: potential dressings for diabetic wound [J]. *J Nanosci Nanotechnol*, 2020, 20(4): 2087-94.
- [27] CAVIGLIA H, LANDRO M E, GALLO E, et al. Is it possible to use autologous adipose graft for wound repair in patients with coagulation disorders [J]? *Haemophilia*, 2016, 22(2): 298-302.
- [28] GE S, KHACHEMOUNE A. The importance of cutaneous innervation in wound healing: from animal studies to clinical applications [J]. *Int J Low Extr Wound*, 2021, doi: 10.1177/15347346211045022.
- [29] 李建毅, 刘志远, 邓呈亮. 脂肪干细胞来源外泌体在组织再生修复中的作用及热点分析[J]. *中国组织工程研究*(LI J Y, LIU Z Y, DENG C L. Function and hot spot of adipose-derived stem cell exosomes in tissue regeneration and repair [J]. *Chinese Journal of Tissue Engineering Research*), 2022, 26(13): 2093-8.
- [30] 王科, 晁生武. 创面愈合相关机制的研究进展[J]. *中华损伤与修复杂志*(WANG K, CHAO S W. Research progress on related mechanisms of wound healing [J]. *Chinese Journal of Injury Repair and Wound Healing*), 2021, 16(1): 81-4.
- [31] 杨燕玲, 孙湘婷, 黄浩, 等. 巨噬细胞调控伤口愈合研究进展[J]. *沈阳药科大学学报*(YANG Y L, SUN X T, HUANG H, et al. Research progress on the involvement and regulation of macrophages in wound healing [J]. *Journal of Shenyang Pharmaceutical University*), 2021, 38(3): 321-7.
- [32] HE X N, DONG Z W, CAO Y N, et al. MSC-derived exosome promotes M2 polarization and enhances cutaneous wound healing [J]. *Stem Cells Int*, 2019, doi: 10.1155/2019/7132708.
- [33] KIM H, WANG S Y, KWAK G, et al. Exosome-guided phenotypic switch of m1 to M2 macrophages for cutaneous wound healing [J]. *Adv Sci*, 2019, doi: 10.1002/adv.201900513.
- [34] PENG P, YU H, XING C, et al. Exosomes-mediated phenotypic switch of macrophages in the immune microenvironment after spinal cord injury [J]. *Biomed Pharmacother*, 2021, doi: 10.1016/j.biopha.2021.112311.
- [35] CAO L, XU H X, WANG G, et al. Extracellular vesicles derived from bone marrow mesenchymal stem cells attenuate dextran sodium sulfate-induced ulcerative colitis by promoting M2 macrophage polarization [J]. *Int Immunopharmacol*, 2019, 72: 264-74.
- [36] DENG F H, YAN J, LU J X, et al. M2 macrophage-derived exosomal mir-590-3p attenuates dss-induced mucosal damage and promotes epithelial repair via the LATS1/YAP/beta-catenin signalling axis [J]. *J Crohns Colitis*, 2021, 15(4): 665-77.
- [37] ZHOU W S, TAHIR F, WANG J C Y, et al. Discovery of exosomes from tick saliva and salivary glands reveals therapeutic roles for CXCL12 and IL-8 in wound healing at the tick-human skin interface [J]. *Front Cell Dev Biol*, 2020, doi: 10.3389/fcell.2020.00554.
- [38] SHAO S, FANG H, ZHANG J L, et al. Neutrophil exosomes enhance the skin autoinflammation in generalized pustular psoriasis via activating keratinocytes [J]. *Faseb J*, 2019, 33(6): 6813-28.
- [39] ZHANG X, SHI H, YUAN X, et al. Tumor-derived exosomes induce N2 polarization of neutrophils to promote gastric cancer cell migration [J]. *Mol Cancer*, 2018, doi: 10.1186/s12943-018-0898-6.
- [40] MAHMOUDI M, TAGHAVI-FARAHABADI M, REZAEI N, et al. Comparison of the effects of adipose tissue mesenchymal stromal cell-derived exosomes with conditioned media on neutrophil

- function and apoptosis [J]. *Int Immunopharmacol*, 2019, doi: 10.1016/j.intimp.2019.105689.
- [41] 郭建忠, 杨磊. 血清外泌体对小鼠烫伤伤口愈合的促进作用及机制研究[J]. *广州医药(GUO J Z, YANG L. Study on promoting effect and mechanism of serum exosomes on scald wound healing in mice [J]. Guangzhou Medical Journal)*, 2019, 50(2): 69-71.
- [42] HAN K Y, TRAN J A, CHANG J H, et al. Potential role of corneal epithelial cell-derived exosomes in corneal wound healing and neovascularization [J]. *Sci Rep-uk*, 2017, doi: 10.1038/srep40548.
- [43] FU-SHIN Y, GAO N, LEE P. Corneal epithelial exosomes in transmitting pathogenic factors causing neuropathy and in treating hyperglycemia-induced delay of epithelial wound healing and sensory nerve regeneration [J]. *Toxicol Lett*, 2020, doi: 10.1016/j.toxlet.2020.05.076.
- [44] GUO S, WANG T, ZHANG S Y, et al. Adipose-derived stem cell-conditioned medium protects fibroblasts at different senescent degrees from UVB irradiation damages [J]. *Mol Cell Biochem*, 2020, 463(1/2): 67-78.
- [45] 肖向阳, 郑德义, 王宝云, 等. 过表达miR-34a脂肪干细胞外泌体调控增生性瘢痕成纤维细胞增殖及凋亡的研究[J]. *安徽医科大学学报(XIAO X Y, ZHENG D Y, WANG B Y. Regulation of exosomes derived from mir-34a overexpression of adipose derived stem cells effects on proliferation and apoptosis of human hypertrophic scar fibroblasts [J]. Acta Universitatis Medicinalis Anhui)*, 2020, 55(6): 887-93.
- [46] 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-uk*, 2020, doi: 10.1038/srep32993.
- [47] LIANG X L, ZHANG L N, WANG S H, et al. Exosomes secreted by mesenchymal stem cells promote endothelial cell angiogenesis by transferring miR-125a [J]. *J Cell Sci*, 2016, 129(11): 2182-9.
- [48] XUE C L, SHEN Y M, LI X C, 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): 456-65.
- [49] ZHANG B, WU X D, ZHANG X, et al. Human umbilical cord mesenchymal stem cell exosomes enhance angiogenesis through the Wnt4/beta-catenin pathway [J]. *Stem Cell Transl Med*, 2015, 4(5): 513-22.
- [50] HAN K Y, TRAN J A, CHANG J H, et al. Potential role of corneal epithelial cell-derived exosomes in corneal wound healing and neovascularization [J]. *Sci Rep*, 2017, doi: 10.1038/srep40548.
- [51] ZHANG Y T, HAO Z C, WANG P F, et al. Exosomes from human umbilical cord mesenchymal stem cells enhance fracture healing through HIF-1 α -mediated promotion of angiogenesis in a rat model of stabilized fracture [J]. *Cell Proliferat*, 2019, doi: 10.1111/cpr.12570.
- [52] QU Q X, PANG Y X, ZHANG C M, et al. Exosomes derived from human umbilical cord mesenchymal stem cells inhibit vein graft intimal hyperplasia and accelerate reendothelialization by enhancing endothelial function [J]. *Stem Cell Res Ther*, 2020, doi: 10.1186/s13287-020-01639-1.
- [53] LIU J W, YAN Z X, YANG F J, et al. Exosomes derived from human umbilical cord mesenchymal stem cells accelerate cutaneous wound healing by enhancing angiogenesis through delivering angiopoietin-2 [J]. *Stem Cell Rev Rep*, 2021, 17(2): 305-17.
- [54] YU M Y, LIU W, LI J X, et al. Exosomes derived from atorvastatin-pretreated MSC accelerate diabetic wound repair by enhancing angiogenesis via Akt/eNOS pathway [J]. *Stem Cell Res Ther*, 2020, doi: 10.1186/s13287-020-01824-2.
- [55] 杨武. 非创伤性股骨头缺血坏死中外泌体miR-100-5p抑制成骨分化和血管生成的机制研究[D]. 重庆: 重庆医科大学, 2021.
- [56] YANG X, WANG J, GUO S L, et al. MiR-21 promotes keratinocyte migration and re-epithelialization during wound healing [J]. *Int J Biol Sci*, 2011, 7(5): 685-90.
- [57] YANG C, LUO L, BAI X Z, et al. Highly-expressed microRNA-21 in adipose derived stem cell exosomes can enhance the migration and proliferation of the HaCaT cells by increasing the MMP-9 expression through the PI3K/Akt pathway [J]. *Arch Biochem Biophys*, 2020, doi: 10.1016/j.abb.2020.108259.
- [58] ZHANG X, CHEN L, XIAO B, et al. Circ_0075932 in adipocyte-derived exosomes induces inflammation and apoptosis in human dermal keratinocytes by directly binding with PUM2 and promoting PUM2-mediated activation of AuroraA/NF-kappa B pathway [J]. *Biochem Biophys Res Co*, 2019, 511(3): 551-8.
- [59] 韩悦. 特应性皮炎患者外周血外泌体microRNA调控角质形成细胞活化及炎症的相关机制的研究[D]. 北京: 北京协和医学院, 2020.
- [60] TAN W, ZHANG Y R, LI M T, et al. MiR-27a-containing exosomes secreted by irradiated skin keratinocytes delayed the migration of unirradiated skin fibroblasts [J]. *Int J Biol Sci*, 2019, 15(10): 2240-55.