

# 细胞外囊泡在移植物抗宿主病诊疗中的研究进展

王章飞<sup>1,2#</sup> 王敏<sup>3#</sup> 吴佩佩<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup>中国科学技术大学生命科学与医学部, 中国科学技术大学附属第一医院检验科, 合肥 230001;

<sup>2</sup>国家医学检验临床医学研究中心核心单位, 合肥 230001;

<sup>3</sup>安徽医科大学生物医学工程学院, 生物医学材料研究与工程转化中心, 合肥 230032)

**摘要** 移植物抗宿主病(GvHD)是同种异体造血干细胞移植(allo-HSCT)后最常发生的一种极易危及生命的并发症。细胞外囊泡(EVs)是一种纳米到微米级尺度大小的生物膜性囊泡, 内含多种活性成分, 如蛋白质、核酸、脂质和代谢物等。近年来, 研究显示, allo-HSCT后患者血清源EVs组分具有独特差异, 因此EVs具有潜在的诊断和预后价值。此外, 以间充质干细胞(MSCs)来源EVs为代表的无细胞疗法在GvHD的预临床前治疗研究中发挥显著治疗功效。在此, 该文不仅概述了EVs在GvHD诊疗中的临床转化价值, 还对工程化EVs在GvHD应用中的最新进展和未来前景进行了综述, 以期定制个性化且毒副作用少的联合疗法提供新策略和理论基础。

**关键词** 细胞外囊泡; 移植物抗宿主病; 间充质干细胞; 生物标志物; 治疗

## Extracellular Vesicles-Based Diagnostic and Therapeutic Applications for Graft-Versus-Host Disease

WANG Zhangfei<sup>1,2#</sup>, WANG Min<sup>3#</sup>, WU Peipei<sup>1,2\*</sup>

*(<sup>1</sup>Department of Laboratory Medicine, the First Affiliated Hospital of USTC, Division of Life Sciences and Medicine, University of Science and Technology of China, Hefei 230001, China; <sup>2</sup>Core Unit of National Clinical Research Center for Laboratory Medicine, Hefei 230001, China; <sup>3</sup>School of Biomedical Engineering, Research and Engineering Center of Biomedical Materials, Anhui Medical University, Hefei 230032, China)*

**Abstract** GvHD (graft-versus-host disease) is one of the most common life-threatening complications after allo-HSCT (allogeneic hematopoietic stem cell transplantation). EVs (extracellular vesicles) are nanometer-to-micron sized biofilm vesicles containing a variety of active ingredients, such as proteins, nucleotides, lipids, and metabolites. In recent years, studies have shown that there are unique differences in serum-derived EVs components in patients after allo-HSCT, so EVs has potential diagnostic and prognostic values. In addition, cell-free therapies, represented by EVs derived from MSCs (mesenchymal stem cells), have shown significant therapeutic efficacy in pre-clinical treatment studies of GvHD. This paper not only summarizes the clinical translational value of EVs in GvHD diagnosis and treatment, but also reviews the latest progress and future prospects of engineered EVs in GvHD, in order to provide a new strategy and theoretical basis for customized and personalized combination therapy with less toxic side effects.

**Keywords** extracellular vesicles; graft-versus-host disease; mesenchymal stem cells; biomarker; therapeutics

收稿日期: 2024-02-22

接受日期: 2024-04-19

国家自然科学基金(批准号: 82303775)、安徽省自然科学基金(批准号: 2308085QH273)、中国博士后科学基金(批准号: 2023M733398)和安徽医科大学科研基金青年项目(批准号: 2023xkj018)资助的课题

#共同第一作者

\*通信作者。Tel: 18852867995, E-mail: peipeiwu@ustc.edu.cn

Received: February 22, 2024

Accepted: April 19, 2024

This work was supported by the National Natural Science of China (Grant No.82303775), the Natural Science Foundation of Anhui Province (Grant No.2308085QH273), the Postdoctoral Science Foundation Project of China (Grant No.2023M733398), and the Anhui Medical University Research Fund Youth Project (Grant No.2023xkj018)

#These authors contributed equally to this work

\*Corresponding author. Tel: +86-18852867995, E-mail: peipeiwu@ustc.edu.cn

移植物抗宿主病 (graft-versus-host disease, GvHD) 是异基因造血干细胞移植 (allogeneic hematopoietic stem cell transplantation, allo-HSCT) 后一种严重的并发症, 25%~70% 的患者在 allo-HSCT 后可诱发 GvHD。在过去几十年里, 临床上治疗 GvHD 的主要手段仍是依赖于诱导整体免疫抑制, 但是由于该方法缺乏精确性, 因而导致了患者继发于感染的非复发死亡率较高, 并且还增加了治疗耐药和血癌复发的风险<sup>[1]</sup>。因此, 临床上亟需探寻新的预防和治疗方法。细胞外囊泡 (extracellular vesicles, EVs) 是一类纳米到微米级大小的、具有脂质双分子层包裹特征的膜性囊泡的统称<sup>[2]</sup>。近年来, 广泛的研究显示 EVs 在自身免疫相关疾病的发生发展、诊断、治疗和预后等过程中发挥重要作用<sup>[3-4]</sup>。EVs 能被活细胞以主动分泌或死细胞以脱落方式释放到细胞外环境, 因而广泛存在于多种体液和细胞上清中, 由于其内含多种蛋白质、核苷酸、脂质和代谢物等成分<sup>[5]</sup>, 并且这些成分能特异地反映来源细胞的特征, 因此 EVs 也是疾病诊断十分有价值的生物标志物<sup>[6]</sup>。研究显示, allo-HSCT 后患者血清源 EVs 组分具有独特差异, 因此, EVs 对 GvHD 具有潜在的早期诊断和预后监测价值。此外, 临床和预临床前研究显示, EVs 作为细胞旁分泌的重要组分, 具有亲代细胞相似的生物学功能<sup>[7]</sup>, 如免疫调节、促增殖抑凋亡、抗炎和抗氧化等功能。干细胞疗法在 GvHD 的治疗中展现良好应用前景, 然而在临床转化中存在的诸多问题限制了其临床使用。近年来, 间充质干细胞 (mesenchymal stem cell, MSCs) 来源 EVs (MSC-EVs) 已被广泛报道能避免其诸多副作用并替代 MSCs 发挥治疗功效, 同时还能显著改善 GvHD 的临床症状和致死率<sup>[8]</sup>。近年来, 研究人员还发现, EVs 能作为一种优越的递送载体<sup>[9]</sup>, 其脂质双层膜表面和内部被个性化设计并加载一些组织靶向分子或增强治疗药物来提高其干预 GvHD 的功效<sup>[10]</sup>。本文将从 GvHD 的疾病分类、发病机制和最新的治疗进展等多个方面来阐述 GvHD 的发生发展, 并重点聚焦于对 EVs 在 GvHD 诊断和治疗中的作用及机制和潜在的临床转化价值作一全面的综述。

## 1 GvHD概述

异基因造血干细胞移植 (allo-HSCT) 依然是治疗白血病、淋巴瘤和多发性骨髓瘤等多种恶性血

液系统疾病的有效方法<sup>[11]</sup>。目前, 单倍体相合造血干细胞移植 (haploidentical stem cell transplantation, haplo-HSCT) 已经在世界范围内广泛展开, 而单倍体相合造血干细胞移植在我国的成功应用, 使得中国造血干细胞移植病例数量快速增长。中国造血干细胞移植登记组的数据显示, 在 2019 年, 我国有 140 家医疗单位共实施了近万例的 allo-HSCT, 其中 haplo-HSCT 占 60%<sup>[12-13]</sup>。尽管 allo-HSCT 在恶性血液系统疾病中的疗效不断提高, 然而 GvHD 仍然是阻碍移植成功的主要合并症和致死病因。

GvHD 是由于 allo-HSCT 后异体供者移植物中的 T 淋巴细胞主动攻击受者体内同种异型抗原所导致的, 主要以皮肤、胃肠道和肝脏为主要目标, 表现为皮肤充血、斑丘疹、顽固性腹泻等<sup>[14]</sup>。根据 GvHD 在 allo-HSCT 后发生的时间, 其主要分为两种形式, 即短于 100 天内发病者称为急性移植物抗宿主病 (acute GvHD, aGvHD), 而超过 100 天后发病者称为慢性移植物抗宿主病 (chronic GvHD, cGvHD)。aGvHD 主要以 Th1 型细胞因子包括 IL-1 $\beta$ 、IL-6 和 IFN- $\gamma$  等为主要介质, 主要导致皮肤、胃肠道和肝脏受累, 少数也可累积其他器官, 是移植后早期死亡的重要并发症之一。相对于急 aGvHD, cGvHD 的发病机制更为复杂, 通常分为 3 个阶段: 急性炎症、慢性炎症免疫力失调和异常组织修复持续导致纤维化。cGvHD 除主要以 Th2 和 Th17 型炎症因子外, 巨噬细胞和 B 细胞也发挥了作用, 巨噬细胞产生的转化生长因子  $\beta$  (transforming growth factor- $\beta$ , TGF- $\beta$ ) 的水平升高会损害调节性 T 细胞 (regulatory T cells, Tregs) 功能, 使得炎症反应加剧。同时, 供体 B 细胞的稳态和耐受机制被扰乱使得记忆功能下降, 被宿体抗原激活后 B 细胞快速扩增, 引起除了皮肤、胃肠道、肝脏外, 更多部位包括肺部和眼睛等感染。主要累积口腔黏膜, 口腔干燥是最早且最常见的征象, 也可累积到皮肤、眼睛、关节、肝脏、胃肠道等组织器官导致其出现相应的临床症状<sup>[15]</sup>。

## 2 细胞外囊泡概述

细胞外囊泡 (EVs) 是细胞主动释放或脱落到细胞外环境的纳米级至微米级大小膜囊泡, 根据 EVs 的生物发生过程、直径大小及生物理化性质等条件, 国际细胞外囊泡学会 (International Society for Extracellular Vesicles, ISEV) 将 EVs 进一步分类。根

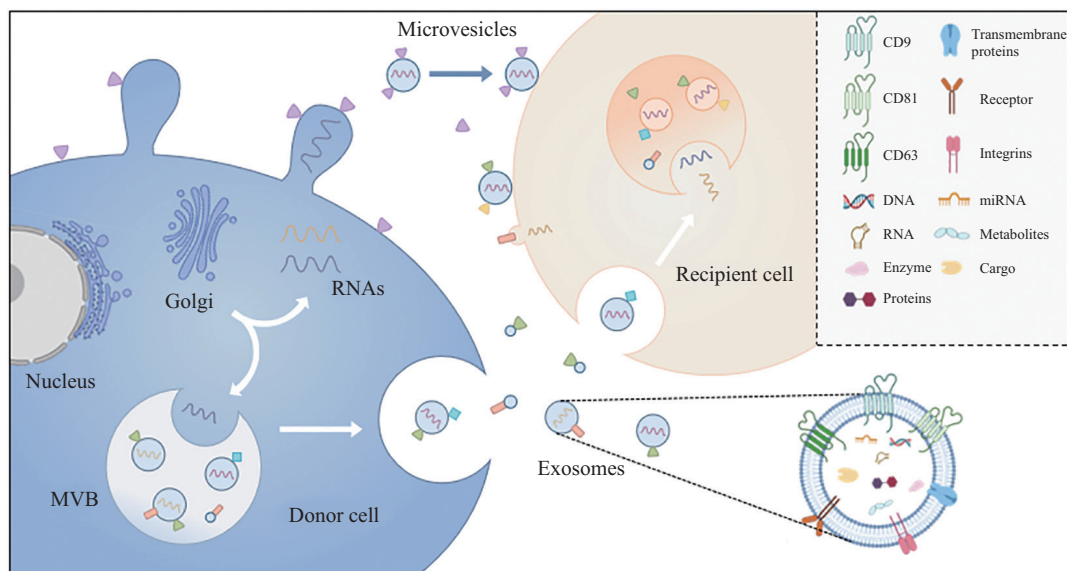


图1 细胞外囊泡的生物发生和功能

Fig.1 Biogenesis and function of extracellular vesicles

据直径大小分为凋亡小体 (apoptotic bodies)、微颗粒 (microparticles)、微囊泡 (microvesicles)、纳米囊泡 (nanovesicles) 和纳米颗粒 (nanoparticles)<sup>[16]</sup>; 根据细胞和组织来源不同分为前列腺来源囊泡 (prostatosomes)、树突细胞来源囊泡 (dexosomes)、癌细胞来源囊泡 (oncosomes)、神经元来源囊泡 (synaptic vesicles)、心肌细胞来源囊泡 (cardiosomes) 和腺病毒相关载体来源囊泡 (vexosomes); 根据功能分为基质小泡 (matrix vesicles) 等; 根据分泌到细胞外特性分为外泌体 (exosomes)、外泌体样囊泡 (exosome-like vesicles)、核外颗粒体 (ectosomes) 等。外泌体是由多泡体 (multivesicular body, MVB) 与质膜融合而形成的囊泡, 微囊泡是由质膜直接向外出芽而形成的囊泡, 凋亡小体是由细胞凋亡后释放的囊泡。目前的研究主要聚焦以下三大类即凋亡小体、微囊泡和外泌体等。EVs 最初被发现时被认为是细胞碎片, EVs 通过直接膜融合、受配体介导的相互作用、多种细胞内吞途径等机制, 将其内部或表面携带的生物活性蛋白或遗传物质从供体细胞转移到受体细胞, 因而发挥多种生物学作用<sup>[17]</sup>(图1)。

经历过去几十年的深入研究, EVs 的多种生物学作用, 包括介导细胞间信号通讯、抗原呈递、免疫调节、促血管形成等功能被逐渐揭示。因此 EVs, 尤其是 MSCs 来源的 EVs 在糖尿病、系统性红斑狼疮、脊髓损伤、恶性血液系统疾病及其相关的 GvHD 等多种复杂难治性疾病中发挥有益治疗作

用。此外, EVs 由于还具有良好的生物相容性、低免疫原性和低毒性、生物可降解性等优势, 逐渐成为纳米医学领域研究的一颗耀眼明星, 工程化 EVs 也为多种疾病的个性化和精准治疗带来新希望<sup>[2,18]</sup>。EVs 的脂质双分子层包裹的大量蛋白质、核苷酸、脂质和代谢物成分被用作生物标志物, 以用于疾病诊疗。在不同的疾病条件下, 不同类型的细胞分泌并释放含有不同蛋白质、核酸和脂质等成分的具有特异性内容物的 EVs, 这些 EV 组分随着起源组织和细胞的变化而变化, 因此, 能特异性地反映其衍生细胞的病理生理状态。此外, 鉴于 EVs 具有细胞类型特异性和稳定特点并且可从体液中获得, 其内多种组分可成为疾病早期诊断、治疗、预后等良好的生物标志物。采用 EVs 作为生物标志物对个体化疾病诊断和监测具有广泛的意义<sup>[19]</sup>。

### 3 EVs在GvHD发生发展中的作用和机制

几乎所有的活细胞均能释放 EVs 到细胞外环境中, 因此, 体液中含有大量的 EVs。这些 EVs 的来源包括供体的造血干细胞, 受体的血液细胞、免疫细胞、肿瘤细胞以及受损的靶细胞等。这些供体或受体细胞来源的 EVs 由于富集了亲本细胞的多种功能分子也许能通过相互串扰作用来影响受体或者供体细胞的功能, 减轻或加重 GvHD 的症状, 并且影响 GvL 效应。研究显示, GvHD 患者循环血液中 EVs 的数量呈现显著上调, 红细胞和血小板释放的 EVs

数量具有显著差异,并与GvHD的发病风险呈一定的相关性<sup>[20]</sup>。这表明研究不同血液细胞释放EVs的数量及调控其差异分泌的机制也许能为GvHD的诊断和治疗提供新的见解。此外,不同免疫细胞来源EVs的膜表面表达了不同的膜蛋白分子,这些不同亚型的囊泡在GvHD病程中具有一定的诊断价值,然而其在疾病中的功能尚未可知。研究人员发现了一种PD-L1<sup>+</sup> EVs在allo-HSCT后6周,其显著升高并与GvHD等级呈正相关,且在成功治疗干预后其表达水平显著下降<sup>[21]</sup>。此外,PD-L1<sup>+</sup> EVs能显著抑制T细胞功能,这一作用可能会直接降低GvL效应,进而导致患者复发风险增加。因此,揭示不同免疫细胞来源的多种亚型EVs,并揭示其携带的功能蛋白或者核苷酸分子在GvHD疾病的发生和进展过程中的具体作用机制具有十分重要的意义。

#### 4 EVs在急性慢性GvHD疾病中的诊断应用价值

cGvHD是HSCT患者术后最重要的长期并发症之一,是非复发死亡的主要原因。cGvHD不仅显著降低了移植后患者的长期生存期和生活质量,还与多种其他共病相关联。尽管目前研究对aGvHD和cGvHD发病机制了解有所提高,但预测其发病的可靠生物标志物仍尚未确定。由于30%~70%的患者在HSCT后发生cGvHD<sup>[22]</sup>,因此,亟需寻找确定合适的早期诊断和预后标志物以期尽早发现和干预疾病。随着液体活检技术的快速发展,从血液、尿液等生物液体中筛选到用于GvHD诊断和预后的生物标志物具有重要的价值(表1)。

多项研究显示,GvHD患者的循环血液中的EVs数量呈现显著上调,EVs分泌量的增加与aGvHD的发病风险具有显著的关联性<sup>[20,23]</sup>。CARNEIRO等<sup>[20]</sup>发现,患者血浆循环EVs中,高水平的总EVs数量(total circulating EV count, TEVs)和红细胞来源EVs数量(erythrocyte-derived EVs, EryEVs)计数与aGvHD的发病具有强相关性,而血小板来源EVs数量(platelet-derived EVs, PEVs)水平与aGvHD的发病风险无关。NAGASAWA等<sup>[23]</sup>发现T细胞特异的CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> EVs和CD3<sup>+</sup>HLA-DR<sup>+</sup> EVs水平与aGvHD的发病风险具有强相关性。通过检测在东京医科和牙科大学医院接受HSCT治疗的20名患者(包括13名儿童和7名成人患者)的外周血来源EVs,他们发现

CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> EVs和CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> EVs水平分别与CD4<sup>+</sup>和CD8<sup>+</sup> T淋巴细胞计数特异性相关,而CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> EVs和CD3<sup>+</sup>HLA-DR<sup>+</sup> EVs数量在GvHD中增加,并比可溶性IL-2受体(soluble IL-2 receptor, IL-2R)更特异性地再现了GvHD的持久性。在移植综合征中,sIL-2R含量明显升高,而CD3<sup>+</sup>HLA-DR<sup>+</sup> EVs含量没有升高。此外,在移植前发生的噬血细胞综合征(hemophagocytic syndrome, HPS)中,铁蛋白和sIL-2R表达量显著增加;然而,CD3<sup>+</sup>HLA-DR<sup>+</sup> EVs的变化很少。CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>、CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>和CD3<sup>+</sup>HLA-DR<sup>+</sup> EVs能有效地刺激细胞介导的免疫反应,并且CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>和CD3<sup>+</sup>HLA-DR<sup>+</sup>比其他生物标志物等传统生物标志物对监测和评估急性GvHD更有用。这些研究结果提示监测循环EVs有望成为GvHD发生发展和治疗预后的有价值生物标志物。

近期,研究显示EVs的表面抗原与aGvHD发病具有潜在相关性<sup>[24-25]</sup>。LIA等<sup>[24]</sup>用13种针对特异性膜蛋白抗体检测了41例接受allo-HCT多发性骨髓瘤患者血清EVs,发现EVs膜抗原CD146、CD31和CD140- $\alpha$ <sup>+</sup> EVs与aGvHD的发病具有强相关性。其中,CD146(MCAM-1)与aGvHD发生的风险增加了近60%,而CD31(PECAM-1)和CD140(PDGFR)的风险分别降低了近40%和60%。后续研究LIA及其同事<sup>[25]</sup>进一步观察监测32例连续患者EVs上CD146、CD31、CD140- $\alpha$ 、CD120- $\alpha$ 、CD26、CD144和CD30等抗原的表达谱及其miRNAs载货与aGvHD发病之间存在显著关联。他们还发现了EVs表达谱与血浆生物标志物(如ST2、sTNFR1和REG3a)之间具有与aGvHD潜在相关性。EVs中CD146、sTNFR1和miR-100或miR-194的组合与aGvHD的发病密切相关,其诊断效能接受者操作特征曲线下面积(area under the receiver operating characteristic curve, AUROC)>0.975。以上研究表明,EVs的内容物如核苷酸或蛋白质等表达谱有望成为aGvHD早期诊断的良好生物标志。

BAUR等<sup>[21]</sup>发现allo-HSCT后患者血浆中存在循环EVs表达PD-L1,PD-L1<sup>+</sup> EVs在allo-HSCT 6周后其EVs上PD-L1的表达水平达到高峰,而这些EVs上PD-L1表达水平与其抑制T细胞的能力和GvHD的发生相关。aGvHD的发展与allo-HSCT后PD-L1高水平EVs的出现有关,并且PD-L1水平与GvHD等级呈正相关,并且在成功的治疗干预后下降。在临床上,联合应用兔抗T淋巴细胞球蛋白(anti-T lymphocyte

表1 EVs在GvHD中的诊断价值  
Table 1 Diagnostic value of EVs in GvHD

EVs来源 Source of EVs	模型 Model	生物标志物 Biomarkers	表达水平 Expression level	ROC	临床意义 Clinical significance	参考文献 References
Plasma circulating EVs	aGvHD	-	↑	-	High TEVs and EryEVs counts are strongly associated with aGvHD, while PEVs levels are not related to the risk of aGvHD	[20]
Serum EVs	aGvHD	CD3 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> EVs, CD3 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup> EVs, CD3 <sup>+</sup> HLA-DR <sup>+</sup> EVs	↑	-	Levels of T cell-specific CD3 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup> EVs and CD3 <sup>+</sup> HLA-DR <sup>+</sup> EVs are strongly associated with aGvHD	[23]
Plasma circulating EVs	aGvHD	EVs membrane antigen CD146, CD31 and CD140- $\alpha$	↑	-	CD146 <sup>+</sup> EVs, CD31 <sup>+</sup> EVs and CD140- $\alpha$ <sup>+</sup> EVs are strongly correlated with aGvHD	[24]
Plasma circulating EVs	aGvHD	CD146, sTNFR1 and miR-100 or miR-194	↑	AUROC >0.975	The combination of CD146, sTNFR1 and miR-100 or miR-194 in EVs is strongly associated with aGvHD	[25]
Plasma circulating EVs	aGvHD	PD-L1 <sup>+</sup> EVs	↑	-	PD-L1 <sup>+</sup> EVs is strongly correlated with aGvHD	[21]
Serum EVs	aGvHD	CD69 <sup>+</sup> EVs	↑	-	High levels of CD69 <sup>+</sup> EVs are significantly associated with aGvHD risk and can be monitored as ATLG medication	[26]
Plasma EVs	cGvHD	miR-29c-3p miR-630, miR-374b-5p	↑ ↓	-	miRNAs profiles in plasma EVs are used for the diagnosis of cGvHD	[27]
Plasma EVs	GvHD	miR-15b-3p, miR-30a-5p, miR-342-3p, miR-130a-3p, miR-145-5p miR-141-3p, miR-486-5p, miR-93-5p, miR-18a-5p, miR-92b-3p	↑ ↓	-	miRNAs in plasma EVs are used to predict GvHD and are associated with disease severity and patient survival	[28]
Plasma exosomes	LA GvHD	miR-128	↑	AUC=0.975	For early noninvasive diagnosis of LA GvHD	[31]

aGvHD: 急性GvHD; cGvHD: 慢性GvHD; LA GvHD: 迟发性aGvHD; TEVs: 总循环EVs; EryEVs: 红细胞来源EVs; PEVs: 血小板来源EVs; ATLG: 兔抗T淋巴细胞球蛋白。-: 未检测; ↑: 升高; ↓: 降低。

aGvHD: acute GvHD; cGvHD: chronic GvHD; LA GvHD: late-onset aGvHD; TEVs: total cycle EVs; EryEVs: erythrocyte origin EVs; PEVs: platelet origin EVs; ATLG: rabbit anti-T lymphocyte globulin。-: not detected; ↑: elevated; ↓: decreased.

globulin, ATLG)疗法是预防GvHD的有效策略, 随机研究已经证明了它在预防GvHD方面的有效性, 然而, 复发仍然是限制其更广泛使用的主要因素。因此, 及早根据宿主特征调整ATLG剂量, 将其免疫重建、复发和感染等副作用降至最低是提高ATLG临床干预效果的有效方式。STORCI等<sup>[26]</sup>研究发现在23例GvHD患者血清中ATLG活性水平显著降低。同时, 在输注前, GvHD患者的CD69<sup>+</sup> EVs浓度升高。另外在12例接受ATLG治疗的HSCT患者的验证队列中获得了一致结果。这提示血清高水平CD69<sup>+</sup> EVs与GvHD的风险增加显著相关, 其有望被定制

为ATLG剂量监测的有效工具, 以用于个性化预防GvHD。

近年来研究表明患者体内循环EVs包裹的miRNAs有望作为aGvHD和cGvHD早期监测的良好生物标志物。LACINA等<sup>[27]</sup>通过检测3例cGvHD和4例无疾病症状的非cGvHD患者miRNAs表达谱发现, 在cGvHD患者中存在3个差异表达miRNAs, 即hsa-miR-630、hsa-miR-374b-5p和hsa-miR-29c-3p, 其中前两者表达水平显著降低, 而hsa-miR-29c-3p表达水平则显著升高。这也提示血浆EVs的miRNAs谱可能作为cGvHD发病的标志物。另一项LIM等<sup>[28]</sup>的研究

显示, 血浆EVs中miRNAs不仅能用于预测GvHD, 并且还和疾病严重程度和患者生存相关。作者采用声流体捕获技术来捕获20例连续接受allo-HSCT的高危/复发恶性血液病患者在移植前后12周的血浆样本中EVs, 他们发现移植后的大多数患者中EVs数量增加了2倍以上。通过对EVs的miRNA表达谱分析发现, 在移植后患者血浆EVs中miR-15b-3p、miR-30a-5p、miR-342-3p、miR-130a-3p和miR-145-5p表达显著上调, 而miR-141-3p、miR-486-5p、miR-93-5p、miR-18a-5p和miR-92b-3p则呈现表达显著下调。重要的是, 他们发现血浆EVs中的上调的miRNAs分别与感染和GvHD呈持续正相关, 而下调的miRNAs与这些并发症呈持续负相关。此外, 移植植物EVs中血小板特异性miR-142-3p的表达也显示与预期的血小板计数动力学相关。

在2005年, 国家卫生研究院(National Institutes of Health, NIH)建立的共识标准新分类中将发生在移植后100天以上的aGvHD定义为迟发性aGvHD(late-onset aGvHD, LA GvHD)<sup>[29]</sup>。根据NIH的这一定义, 20%~40%的cGvHD患者将被重新考虑为LA GvHD。一些报道显示, 与非GvHD相比, LA GvHD也与异体HSCT后更高的非复发死亡率相关<sup>[30]</sup>。LA GvHD的潜在机制知之甚少, 识别EVs中差异表达的miRNAs对揭示miRNA在这种疾病中的作用具有重要的意义。YOSHIKAWA等<sup>[31]</sup>收集了5例LA GvHD、5例非GvHD和8例健康对照患者血浆中的EVs并进行了miRNAs表达谱分析。他们发现在LA GvHD和非GvHD之间共有55个差异的表达miRNAs。其中, 通过对差异表达最显著的10个miRNAs(miR-423-5p、miR-19a、miR-142-3p、miR-128、miR-193b、miR-30c、miR-193a、miR-191、miR-125b和miR-574-3p)进一步验证发现, miR-128在LA GvHD发病时上调最为显著, AUC=0.975, MirTarBase分析显示, miR-128的靶基因参与了免疫系统和炎症反应。以上的这些结果进一步提示, EVs中miR-128有望成为一种全新的、无创的生物标志物用于LA GvHD早期诊断。

## 5 EVs在急慢性GvHD及其相关并发症治疗中的作用和机制

MSC-EVs已应用于多种免疫性疾病的治疗。同种异体人MSCs产品在临床上可用于治疗GvHD,

但临床应用的数据显示这些MSCs产品在治疗实践中具有一定局限性。相当比例的aGvHD患者对人骨髓/脐带间充质干细胞的细胞治疗有反应。然而, 这些细胞改善aGvHD相关并发症的机制仍有待被阐明。MSC-EVs具有独特的生物分布和重要的剂量依赖性治疗效果。最近一些研究揭示了MSC-EVs在预临床和临床研究中展现出良好的治疗效果, 其携带的一些特异性miRNAs、膜蛋白、膜脂质及可溶性因子结合等组分通过对T细胞介导的适应性免疫和抗原提呈细胞介导的先天免疫的调控和对损伤靶器官的直接再生作用等多种机制, 进而治疗GvHD及其相关并发症(表2)。

### 5.1 EVs在急慢性GvHD及其相关并发症治疗中的机制

aGvHD是发生于allo-HSCT后的一种常见并发症。在重建供者免疫过程中, 来自受者和(或)供者的抗原提呈细胞通过识别从受损的受体组织/器官和/或病原体相关分子模式中释放的损伤相关分子模式而启动。这些组织不相容的多态性抗原被供者来源的同种反应性T细胞识别后, 对受体细胞产生免疫应答, 造成炎症、组织损伤和器官衰竭等症状。其中, 胃肠道、肝脏和皮肤是GvHD最主要受损的靶器官, 导致这一现象的主要原因可能是由于这些部位抗原提呈细胞数量较多, 供体来源的同种反应性T细胞更倾向于聚集到这些部位, 诱发免疫应答, 造成靶器官损伤<sup>[32]</sup>。因此, 促进GvHD患者受损靶器官的再生修复并恢复免疫微环境的稳态是治疗GvHD的有效手段。研究显示, MSC-EVs在多种组织损伤模型中均具有促进细胞增殖和血管形成、抑制细胞凋亡和炎症反应、调节免疫微环境平衡等多种功能<sup>[33]</sup>。在急慢性GvHD及其并发症模型中, MSC-EVs均能够有效抑制炎细胞因子的表达并促进抗炎因子的表达, 从而改善allo-HSCT所致的炎症因子风暴<sup>[34]</sup>。此外, MSC-EVs还能通过促进巨噬细胞向抗炎M2表型极化<sup>[35]</sup>, 调节树突状细胞和抗原提呈细胞的功能<sup>[36-37]</sup>, 改善CD4<sup>+</sup>和CD8<sup>+</sup>T细胞亚群及功能<sup>[38]</sup>, 抑制效应性T细胞的激活分化和细胞毒作用以及促进Tregs细胞表达等作用来恢复免疫稳态<sup>[39-41]</sup>, 进而延长GvHD小鼠的存活时间并改善其生活质量。

### 5.2 EVs在aGvHD治疗中的作用

在接受匹配的相关或非相关的异体干细胞移植患者中, 35%~50%患者出现严重的GvHD(II~IV

表2 EVs在GvHD及其相关并发症治疗中的应用

Table 2 Application of EVs in the treatment of GvHD and its related complications

EVs来源	模型	货物分子	靶基因或通路	作用效果	参考文献
Source of EVs	Model	Cargos	Target genes or pathways	Effect	References
hucMSC-EVs, mBMMSC-EVs	GvHD-associated dry eye	miR-204	Targeting the IL-6/IL-6R/STAT3 signaling pathway	GvHD-associated dry eye was improved by regulating the polarization of M2-type macrophages	[35]
hucMSC-EVs	aGvHD	ATO	Targeting the mTOR-autophagy signaling pathway	Reduce the severity of aGvHD by promoting M1 to M2 polarization	[10]
hBMMSC-EVs	aGvHD	miR-125a-3p CXCL12	-	Inhibit the functional differentiation of primary T cells into effector T cells, and the CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup> Foxp3 <sup>+</sup> regulatory T cell population was retained	[39]
hBMMSC-EVs	cGvHD	-	-	CD4 <sup>+</sup> T cells and Th17 cells were inhibited and Tregs were induced	[42]
mBMMSC-EVs	cGvHD	miR-21	Targeting the PTEN/AKT/Foxp3 signaling pathway	Improvement of immunomodulatory properties of regulatory Treg	[40-41]
hBMMSC-EVs	x-GvHD	CD73	-	Promote adenosine immunosuppression	[38]
hPMSC-EVs	cGvHD	-	-	-	[43]
ihESC-EVs	x-GvHD	-	-	The production of Tregs was enhanced through APC mediated pathway	[37]
hBMMSC-EVs	aGvHD	-	-	-	[8]
hucMSC-EVs mb-MSC-EVs	aGvHD	miR-223	ICAM-1	Decrease donor T cell migration and expression of inflammatory factors	[44]
hucMSC-EVs	aGvHD	-	-	Modulate immune response	[45]
hBMMSC-EVs	aGvHD	-	-	Regulate DC and T cell subsets and function, inhibit inflammatory response	[36]

MSC: 间充质干细胞/基质细胞; BMMSC: 骨髓间充质干细胞; hucMSCs: 人脐带间充质干细胞; GvHD: 移植物抗宿主病; ATO: 三氧化二砷; Tregs: 调节性T细胞; x-GvHD: 人-鼠异种GvHD; hPMSC: 人胎盘MSC; ihESC: 永生化人胚胎干细胞衍生MSC; mb-MSC: 小鼠致密骨MSC; LA GvHD: 晚发型aGvHD。

MSC: mesenchymal stem/stromal cell; BMMSC: bone marrow MSC; hucMSCs: human umbilical cord MSCs; GvHD: graft-versus-host disease; ATO: arsenic trioxide; Tregs: regulatory T cells; x-GvHD: human-into-mouse xenogeneic GvHD; hPMSC: human placenta MSC; ihESC: immortalized human embryonic stem cell-derived MSC; mb-MSC: murine compact bone MSC; LA GvHD: late-onset aGvHD.

级), 多达50%的GvHD患者无法用皮质类固醇控制。由于缺乏确定治疗方案, MSCs已成为治疗严重难治性aGvHD的二线治疗策略。MSCs已被用于治疗aGvHD, 因为它们可以释放多种介质, 包括免疫抑制分子、生长因子、趋化因子和外泌体。不同研究探讨了MSCs给药对GvHD的影响, 并得到了不同结果。KORDELAS等<sup>[8]</sup>首次报道了MSC-EVs骨髓增生异常综合征导致的外周血造血干细胞移植(与hla相同的女性供体)后的黏膜GvHD的临床病例。此外, 由于继发性AML, 她接受了来自一个与hla相同的男性供体的异体PBSCT, 导致超急性皮肤GvHD(IV级)。患者表现出严重的肠道和皮肤GvHD, 并接受类固醇和MSC-EVs治疗。MSC-EVs治疗开始后不久, 患者外周血单核细胞释放的促炎细胞因子产量

减少, 并且临床GvHD症状显著改善, 表现为MSC-EVs治疗后腹泻体积客观上减少, 皮肤和黏膜移植物抗宿主病的临床症状在两周内也得到了显著的缓解, 即使在MSC-EVs治疗后4个月也保持稳定。由于临床反应, 类固醇的剂量可以从125 mg/d减少到MSC-EVs治疗后的30 mg/d。病人的病情已经稳定了好几个月。尽管患者在MSC-EVs应用7个月后死于肺炎, 但所获得的结果让作者相信MSC-EVs可能为治疗难治性GvHD和潜在的其他炎症相关疾病提供一个潜在的新的和安全的新工具。

WANG等<sup>[45]</sup>发现hucMSC-EVs治疗能调节免疫反应来预防危及生命的aGvHD。进一步研究表明, 输注EVs能显著减轻aGvHD小鼠的腹泻、弓背等症状以及组织病理损伤, 并降低死亡率, 并且EVs治疗

后CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T细胞的频率和绝对数量显著降低,而CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>和CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T细胞比例升高;血清IL-2、TNF- $\alpha$ 和IFN- $\gamma$ 水平降低,血清IL-10水平升高。体外实验发现EVs能呈剂量依赖性抑制丝裂原诱导的脾细胞增殖,并抑制促炎细胞因子IL-2、TNF- $\alpha$ 和IFN- $\gamma$ 表达,促进IL-10表达。该研究的结果也表明hucMSC-EVs是预防同种异体-HSCT后aGvHD的理想替代方案。

来自骨髓MSCs-EVs的miRNAs在免疫应答的调节中起着关键作用。然而,miRNAs在治疗aGvHD中的作用尚不清楚。LIU等<sup>[44]</sup>通过高通量测序发现,miR-223在hucMSC-EVs和mBMMSC-EVs中均高表达,并揭示了MSC-EVs衍生的miR-223通过靶向ICAM-1来抑制供体T细胞的迁移从而缓解aGvHD症状。机制研究显示,miR-223能抑制小鼠淋巴内皮细胞中ICAM-1表达来抑制T细胞的黏附和迁移,miR-223 agomiR输注可减轻aGvHD的临床症状,减少供体T细胞向脾脏、肝脏和肠道的浸润,并降低炎症细胞因子IFN- $\gamma$ 、TNF- $\alpha$ 和IL-17的表达水平。FUJII等<sup>[39]</sup>系统地给予人骨髓MSC来源EVs(human bone marrow derived from MSC EVs, hBMMSC-EVs)不仅延长了aGvHD小鼠生存期,还减轻了多种GvHD靶器官损伤。在EVs处理的GvHD小鼠中CD4<sup>+</sup>和CD8<sup>+</sup> T细胞被抑制,并且CD62L<sup>-</sup>CD44<sup>+</sup>与CD62L<sup>+</sup>CD44<sup>-</sup> T细胞的比例降低,这提示EVs能抑制T细胞从幼稚表型到效应表型表达的功能分化。此外,EVs还保存了CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>调节性T细胞群。miRNA微阵列筛选发现EVs中miR-125a-3p的上调最为显著,并且其下游靶基因与T细胞增殖抑制密切相关。本文首次揭示了输注hBMMSC-EVs能显著改善aGvHD的生存和症状,这一作用与保存循环幼稚T细胞高度相关,EVs中miRNAs表达谱在这一过程中扮演着重要作用。近期,LI等<sup>[36]</sup>的研究发现hBMMSC-EVs能通过调节DCs和T细胞亚群的功能,抑制小鼠的炎症反应来减轻aGvHD导致的病理损伤,促进小鼠存活。EVs干预使得IL-2、TNF- $\alpha$ 和IFN- $\gamma$ 表达水平降低,IL-10表达量增加,小鼠体重减轻减少,临床评分和死亡率降低。深入研究发现,EVs处理导致了CD8 $\alpha$ <sup>+</sup>常规DCs和CD11b<sup>+</sup>常规DCs增加7至8倍,并改变了辅助性T细胞和Treg亚群,降低了细胞毒性和细胞毒性T细胞的增殖,从而有利于aGvHD小鼠炎症抑制。

受道德、伦理、法律等诸多方面因素的制约,人体实验的开展而受到严格限制,人-小鼠GvHD(xenogeneic GvHD, x-GvHD)模型由于可靠且稳定等多种优势也成为了GvHD研究更加理想的实验工具。AM-ARNATH等<sup>[38]</sup>发现CD73表达的BMMSC-EVs介导腺苷基的免疫抑制进而能改善x-GvHD。作者首先建立了一个由人CD4<sup>+</sup> Th1细胞死亡构成的x-GvHD模型,并探索了使用临床级BMMSCs产物的免疫调节,结果发现BMMSCs能通过显著抑制Th1细胞效应功能来逆转已建立的、致死的x-GvHD。BMMSCs的植入仅限于肺部,而不影响调节性T细胞,这提示BMMSCs的旁分泌机制是介导这一作用的关键机制,深入研究发现BMMSCs受者血清中的CD73表达的EVs水平显著增加,并促进腺苷在体外的积累。BMMSCs介导的免疫调节作用被腺苷A2A受体拮抗剂的药物治疗完全消除。为研究内在作用机制揭示其潜在的临床相关性,作者检测了BMMSCs治疗前后收集到的患者血清样本中MSC-EVs含量,发现了在BMMSCs治疗后患者血清样本中表达CD73促进腺苷体的MSC-EVs积累。总之,BMMSCs通过旁分泌甲酶促进腺苷基的免疫抑制进而有效调节实验性GvHD。在另一个研究中,ZHANG等<sup>[37]</sup>发现永生人胚胎干细胞来源的MSCs(immortalized human embryonic stem cell-derived MSCs, ihESC-MSCs)来源EVs增加了异体皮肤移植小鼠的Treg的产生,但在未移植的小鼠中没有。因此,作者推测激活的免疫系统是EVs介导的Treg产生的关键。为了验证MSC-EVs是否能诱导CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T细胞或CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>细胞的产生,作者将MSC-EVs与被抗CD3/CD28单克隆抗体或富含异体抗原提呈细胞(antigen presenting cells, APC)的脾脏CD11c<sup>+</sup>细胞激活的小鼠脾CD4<sup>+</sup> T细胞进行共培养。结果显示,MSC-EVs能诱导CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T细胞或CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> Treg被转基因CD11c<sup>+</sup>细胞激活,而不是抗CD3/CD28单抗激活。这种诱导是EVs和APC的剂量依赖性的。MSC-EVs也被用于致命的嵌合人-SCID小鼠GvHD模型,其中人外周血单个核细胞被注入辐照的NSG小鼠以诱导GvHD。在由移植的人APC刺激的人抗小鼠CD4<sup>+</sup>T细胞效应物诱导GvHD的小鼠GvHD模型中,MSC-EVs减轻了GvHD症状并增加了生存率。MSC-EVs处理的存活小鼠的CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CD127<sup>low/-</sup> Tregs水平显著高于用人肿瘤坏死因子抑制剂依那西普处理的存活小鼠。



MSC-EVs通过APC介导的途径在体内和体外增强Treg的产生。

### 5.3 EVs在cGvHD治疗中的作用

LAI等<sup>[42]</sup>发现hBMSC-EVs通过对GvHD效应T细胞发挥强大的免疫调节作用来有效地延长cGvHD小鼠生存期,降低小鼠的临床和病理评分,抑制皮肤、肺和肝脏的纤维化进程。在EVs干预cGvHD过程中,CD4<sup>+</sup>T细胞活化及其对肺的浸润减少,Th17细胞相关转录因子和促炎细胞因子的表达量明显降低,并能抑制表达IL-17的致病性T细胞和诱导表达IL-10的调节细胞。在体外,EVs阻断了来自健康供体和cGvHD患者的PBMCs中Th17细胞的分化,改善了Treg表型。hBMSC-EVs可通过抑制Th17细胞增殖和活性,诱导Treg表达来提高cGvHD的生存,改善病理损伤。NOROOZNEZHAD等<sup>[43]</sup>报道第二例皮肤cGVHD患者给予EVs治疗病例,显示了团队和患者临床可接受的结果。结果保持稳定4个月,无复发。研究表明,患者接受hPMSC来源EVs治疗后,皮肤cGVHD引起的体征和症状被显著减轻,主要表现在如皮肤溃疡、伤口、角化和萎缩性病变的发生率和严重程度降低,并观察到伤口的愈合加速等情况。此外,在EVs治疗后,皮肤的硬化和干燥程度也有了明显的改善。本研究仅调查了hPMSC来源EVs在治疗cGVHD中的作用,作者建议还应该研究其他来源的MSCs如BMMSCs对cGVHD治疗的差异。这被认为可以提高hucMSC-EVs的治疗活性。

### 5.4 EVs在GvHD相关并发症治疗中的作用

GvHD相关干眼症以眼表广泛的炎症破坏为特征,并导致难以忍受的疼痛和视力损害,目前临床治疗方法提供的效果十分有限。ZHOU等<sup>[35]</sup>报道了MSC-EVs能通过抑制炎症和改善小鼠及人类的上皮细胞恢复缓解GvHD相关干眼病。在一项前瞻性临床试验中,作者发现人脐带MSCs来源EVs(human umbilical cord MSCs derived EVs, hucMSC-EVs)能使28只患有难治性GvHD相关干眼症患者的眼病症状得到显著改善,hucMSC-EVs治疗干预后荧光素评分降低,泪膜破裂时间延长,泪液分泌量增加,OSDI评分降低。同样,在苯扎氯铵(benzalkonium chloride, BAC)诱导的小鼠GvHD相关干眼症模型中,小鼠骨髓MSC来源EVs(mBMSC-EVs)治疗也有效缓解了干眼症的症状。机制研究发现,MSC-EVs中富集的一种

miR-204分子能靶向IL-6/IL-6R/STAT3信号轴将促炎的M1型巨噬细胞重编程为免疫抑制的M2型巨噬细胞来减弱干眼症。

## 6 工程化EVs在GvHD及其相关并发症治疗中的作用和机制

由于EVs具有良好的生物相容性和理化稳定性等优势,因此,其正成为一种优越的递送载体被越来越多的研究人员认可。HucMSC-EVs和三氧化砷(arsenic trioxide, ATO)均已被证明通过免疫调节来治疗aGvHD。除了免疫调节外,hucMSC-EVs具有独特的药物传递功能,这被认为可以提高其活性。ATO是治疗急性早幼粒细胞白血病的有效药物,然而因显著的毒性限制了广泛的临床使用。KAVIAN等<sup>[46]</sup>发现应用ATO可改善硬皮病GvHD小鼠的临床症状,而LIU等<sup>[47]</sup>也发现ATO能使巨噬细胞向M2状态转移来延长aGvHD小鼠的生存期。其他的研究报道也显示ATO有望治疗免疫失调疾病,如实验性结肠炎和自身免疫性脑脊髓炎、类风湿性关节炎、系统性红斑狼疮<sup>[48-51]</sup>,这表明ATO有望成为治疗GvHD的新方法。因此,利用hucMSC-EVs递送ATO在降低其毒性同时还能提高GvHD的治疗疗效。SU等<sup>[10]</sup>制备了一种ATO负载的hucMSC-EVs来干预aGVHD,体内外结果显示,ATO-hucMSC-EVs主要通过调节mTOR-自噬信号将炎症性巨噬细胞重编程为M2表型来降低aGVHD的严重程度,而不减弱GvL活性。miRNAs作为一类小核苷酸已被广泛的应用到基因治疗领域。ZHOU等<sup>[35]</sup>发现MSC-EVs富含的miR-204在预临床实验和前瞻性临床试验中均有效缓解GvHD相关干眼病的临床症状。随后,为了实现更高效的治疗功效,作者通过基因操纵的方式构建了一种miR-204前体过表达的L929细胞系,并分离了miR-204超载的L929-EVs,发现其更加显著地减轻了干眼症症状,这一工程化EVs治疗平台的建立也为复杂性GvHD相关干眼病的治疗带来了新思路 and 希望。Tregs是CD4<sup>+</sup>T细胞的一个亚群,可能对包括aGvHD在内的同种免疫反应发挥抑制作用,并且一些miRNAs参与了GvHD的病理生理过程。BMMSCs被发现可以调节体内T细胞的稳态,从而保护allo-HCT后患者免受潜在致命的GvHD事件影响。表皮生长因子(epidermal growth factor, EGF)被报道能诱导miR-21和AKT的表达,提高体外细胞存

活率。此外, miR-21水平与Foxp3(forkhead box P3)表达呈正相关,后者影响调节天然Tregs的功能。研究中报道过表达miR-21可以促进BMMSCs的增殖、侵袭和分化损伤。ZHU等<sup>[40]</sup>采用EGF促进BMMSCs中c-jun磷酸化,进而提高了BMMSC-EVs中miR-21表达水平,从而促进了Tregs中Foxp3的表达,从而提高BMMSCs对aGvHD的治疗效果。在aGvHD小鼠模型中,EGF通过降低IFN- $\gamma$ 表达水平和减轻器官损伤来显著增加BMMSCs的治疗功效。

## 7 总结与展望

过去几十年来的研究显示, EVs在多种疾病包括移植宿主病的诊断和治疗等方面具有重要优势,这使得它们在医学研究和临床应用中得到了广泛的关注。EVs几乎能被所有的细胞分泌和释放,并广泛存在于细胞培养上清液及多种体液如血液、尿液、脑脊液、唾液等中。EVs的天然脂质双分子层结构的存在能保护其内部装载的货物免受胞质内酶的降解,使得其内部携带的多种功能分子如核酸、蛋白质、脂质以及代谢物等成分稳定的存在于细胞外环境中,这一独特的优势使得EVs正在成为极具临床诊断和转化应用价值的一种循环标志物。多项研究显示,循环EVs的数量、膜蛋白和内部的核酸分子在急性GvHD的发生和发展过程中出现显著的差异,这也进一步提示,研究人员通过检测EVs可以用于急性GvHD的预防、诊断和预后监测以及指导临床的用药。研究人员通过揭示GvHD疾病发生发展过程中EVs蛋白质和核酸表达谱及不同细胞亚群的EVs分泌数量的高低水平, GvHD患者来源的EVs有望成为预防、诊断和监测疾病发展以及患者的生存状况的良好生物标志物。

EVs具有同亲本细胞相似的生物学功能,同时还具有低免疫原性、良好的生物相容性,并且更倾向于到达受损伤部位等优势,因此,近年来,科学家正逐渐尝试用天然的EVs尤其是干细胞源EVs来治疗复杂难治性疾病,包括糖尿病<sup>[52]</sup>、系统性红斑狼疮<sup>[53]</sup>、类风湿关节炎<sup>[54]</sup>、恶性血液系统肿瘤<sup>[55]</sup>、移植宿主病<sup>[54]</sup>以及其他免疫失调性疾病<sup>[56]</sup>等。研究显示,机体的表面屏障再生失败和不适应的修复导致纤维化在GvHD的发病和进展过程中扮演着十分重要的作用。尽管使用免疫抑制治疗可以控制GvHD相关的炎症,但机体脏器的组织稳态受损会

导致器官的长期损伤进而影响患者的生活质量<sup>[1]</sup>。

一些研究显示, MSCs及其来源EVs能通过介导组织再生和修复来降低疾病的严重程度、减少死亡率来治疗或改善急性慢性GvHD。相比传统的脂质纳米材料, EVs由于具备更加良好的生物相容性、安全性以及理化稳定性等优势,正被研究人员逐渐视为天然的药物和基因递送载体。通过将多种生物活性分子装载到EVs内部或对EVs表面进行组织或器官的特异性靶向修饰,这些功能化的EVs修饰策略不仅能提高药物的体内循环时间、减少药物清除率以及降低药物的毒副作用,还能同时实现药物的精准靶向递送,进而提高疾病的治疗功效。近年来的一些研究证实,工程化的EVs可以通过递送核酸或药物等治疗分子来达到增强治疗急性慢性GvHD及其相关并发症的目的<sup>[10,35,40-41]</sup>,这也为疾病的治疗带来了新的思路和策略。

目前干细胞包括胚胎干细胞、间充质干细胞等来源的EVs在提纯与鉴定、生物活性测定以及质量控制等方面还存在一些不同程度的分歧和争议,尚缺乏统一标准。为了应对这些挑战,并积极推进干细胞源EVs在疾病治疗领域的研究与应用,中国研究型医院学会细胞外囊泡研究与应用分会组织国内专门从事干细胞源EVs研究的专家学者,在2022年首次制定并公布了《人多能干细胞来源的小细胞外囊泡》(T/CRHA 002-2021)及《人间充质干细胞来源的小细胞外囊泡》(T/CRHA 001-2021)二项全国团体标准。尽管EVs在疾病的诊断和治疗等方面具有无限的应用潜力和优势,但其在临床转化和应用方面还存在诸多的瓶颈和挑战,包括提取纯度和标准、规模化生产制备以及长期体内应用的安全性评价等方面仍然还有很长的路要走。相信随着国内外从事EVs研究学者的共同努力,以及EVs分离和纯化技术的进一步发展,相信EVs在诊断和应用中面临的一些瓶颈将会逐渐被解决,干细胞EVs在治疗GvHD等多种复杂难治性临床疾病中的应用和转化也将更具前景和应用价值。

## 参考文献 (References)

- [1] CHAKRAVERTY R, TESHIMA T. Graft-versus-host disease: a disorder of tissue regeneration and repair [J]. *Blood*, 2021, 138(18): 1657-65.
- [2] ANDALOSSI S E L, MÄGER I, BREAKEFIELD X O, et al. Extracellular vesicles: biology and emerging therapeutic opportu-

- nities [J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2013, 12(5): 347-57.
- [3] BAI L, SHAO H, WANG H, et al. Effects of mesenchymal stem cell-derived exosomes on experimental autoimmune uveitis [J]. *Sci Rep*, 2017, 7(1): 4323.
- [4] WU X, LIU Y, WEI W, et al. Extracellular vesicles in autoimmune vasculitis: little dirt lights the fire in blood vessels [J]. *Autoimmun Rev*, 2019, 18(6): 593-606.
- [5] PEGTEL D M, GOULD S J. Exosomes [J]. *Annu Rev Biochem*, 2019, 88: 487-514.
- [6] BUZAS E I. The roles of extracellular vesicles in the immune system [J]. *Nat Rev Immunol*, 2023, 23(4): 236-50.
- [7] KOIJMANS S A A, DE JONG O G, SCHIFFELERS R M. Exploring interactions between extracellular vesicles and cells for innovative drug delivery system design [J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2021, 173: 252-78.
- [8] KORDELAS L, REBMANN V, LUDWIG A K, et al. MSC-derived exosomes: a novel tool to treat therapy-refractory graft-versus-host disease [J]. *Leukemia*, 2014, 28(4): 970-3.
- [9] LIANG Y, DUAN L, LU J, et al. Engineering exosomes for targeted drug delivery [J]. *Theranostics*, 2021, 11(7): 3183-95.
- [10] SU Y, SUN X, LIU X, et al. hUC-EVs-ATO reduce the severity of acute GVHD by resetting inflammatory macrophages toward the M2 phenotype [J]. *J Hematol Oncol*, 2022, 15(1): 99.
- [11] SAAD A, DE LIMA M, ANAND S, et al. Hematopoietic cell transplantation, version 2.2020, NCCN clinical practice guidelines in oncology [J]. *J Natl Compr Canc Netw*, 2020, 18(5): 599-634.
- [12] XU L P, LU P H, WU D P, et al. Hematopoietic stem cell transplantation activity in China 2019: a report from the Chinese Blood and Marrow Transplantation Registry Group [J]. *Bone Marrow Transplant*, 2021, 56(12): 2940-7.
- [13] 中华医学会血液学分会干细胞应用学组. 中国异基因造血干细胞移植治疗血液系统疾病专家共识(III)——急性移植物抗宿主病(2020年版)[J]. *中华血液学杂志(STEM CELL APPLICATION GROUP, CHINESE SOCIETY OF HEMATOLOGY, CHINESE MEDICAL ASSOCIATION. Chinese consensus of allogeneic hematopoietic stem cell transplantation for hematological disease (III): acute graft-versus-host disease, 2020 [J]. Chinese Journal of Hematology*, 2020, (7): 529-36.
- [14] MALARD F, HOLLER E, SANDMAIER B M, et al. Acute graft-versus-host disease [J]. *Nat Rev Dis Primers*, 2023, 9(1): 27.
- [15] GREINIX H T, LODDENKEMPER C, PAVLETIC S Z, et al. Diagnosis and staging of chronic graft-versus-host disease in the clinical practice [J]. *Biol Blood Marrow Transplant*, 2011, 17(2): 167-75.
- [16] THÉRY C, WITWER K W, AIKAWA E, et al. Minimal information for studies of extracellular vesicles 2018 (MISEV2018): a position statement of the International Society for Extracellular Vesicles and update of the MISEV2014 guidelines [J]. *J Extracell Vesicles*, 2018, 7(1): 1535750.
- [17] COCOZZA F, GRISARD E, MARTIN-JAULAR L, et al. SnapShot: extracellular vesicles [J]. *Cell*, 2020, 182(1): 262.e1.
- [18] STERZENBACH U, PUTZ U, LOW L H, et al. Engineered exosomes as vehicles for biologically active proteins [J]. *Mol Ther*, 2017, 25(6): 1269-78.
- [19] ESCUDÉ MARTINEZ DE CASTILLA P, TONG L, HUANG C, et al. Extracellular vesicles as a drug delivery system: a systematic review of preclinical studies [J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2021, 175: 113801.
- [20] CARNEIRO T X, MARRESE D G, SANTOS M G D, et al. Circulating extracellular vesicles as a predictive biomarker for acute graft-versus-host disease [J]. *Exp Hematol*, 2023, 117: 15-23.
- [21] BAUR R, KARL F, BÖTTCHER-LOSCHINSKI R, et al. Accumulation of T-cell-suppressive PD-L1 (high) extracellular vesicles is associated with GvHD and might impact GvL efficacy [J]. *J Immunother Cancer*, 2023, 11(3): e006362.
- [22] JAGASIA M H, GREINIX H T, ARORA M, et al. National institutes of health consensus development project on criteria for clinical trials in chronic graft-versus-host disease: I. The 2014 Diagnosis and Staging Working Group report [J]. *Biol Blood Marrow Transplant*, 2015, 21(3): 389-401.
- [23] NAGASAWA M, MITSUIKI N, YANAGIMACHI M, et al. Utility of novel T-cell-specific extracellular vesicles in monitoring and evaluation of acute GVHD [J]. *Int J Hematol*, 2021, 113(6): 910-20.
- [24] LIA G, BRUNELLO L, BRUNO S, et al. Extracellular vesicles as potential biomarkers of acute graft-vs-host disease [J]. *Leukemia*, 2018, 32(3): 765-73.
- [25] LIA G, DI VITO C, BRUNO S, et al. Extracellular vesicles as biomarkers of acute graft-vs-host disease after haploidentical stem cell transplantation and post-transplant cyclophosphamide [J]. *Front Immunol*, 2021, 12: 816231.
- [26] STORCI G, BARBATO F, RICCI F, et al. Pre-transplant CD69<sup>+</sup> extracellular vesicles are negatively correlated with active ATLG serum levels and associate with the onset of GVHD in allogeneic HSCT patients [J]. *Front Immunol*, 2022, 13: 1058739.
- [27] ŁACINA P, CROSSLAND R E, WIELIŃSKA J, et al. Differential expression of miRNAs from extracellular vesicles in chronic graft-versus-host disease: a preliminary study [J]. *Adv Clin Exp Med*, 2023, 32(5): 539-44.
- [28] LIM H C, SONEJI S, PÁLMAISON R, et al. Development of acoustically isolated extracellular plasma vesicles for biomarker discovery in allogeneic hematopoietic stem cell transplantation [J]. *Biomark Res*, 2021, 9(1): 6.
- [29] FILIPOVICH A H, WEISDORF D, PAVLETIC S, et al. National institutes of health consensus development project on criteria for clinical trials in chronic graft-versus-host disease: I. Diagnosis and staging working group report [J]. *Biol Blood Marrow Transplant*, 2005, 11(12): 945-56.
- [30] OMER A K, WEISDORF D J, LAZARYAN A, et al. Late acute graft-versus-host disease after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation [J]. *Biol Blood Marrow Transplant*, 2016, 22(5): 879-83.
- [31] YOSHIZAWA S, UMEZU T, SAITOH Y, et al. Exosomal miRNA signatures for late-onset acute graft-versus-host disease in allogeneic hematopoietic stem cell transplantation [J]. *Int J Mol Sci*, 2018, 19(9): 2493.
- [32] HILL G R, BETTS B C, TKACHEV V, et al. Current concepts and advances in graft-versus-host disease immunology [J]. *Annu Rev Immunol*, 2021, 39: 19-49.
- [33] KESHTKAR S, AZARPIRA N, GHAHREMANI M H. Mesenchymal stem cell-derived extracellular vesicles: novel frontiers in regenerative medicine [J]. *Stem Cell Res Ther*, 2018, 9(1): 63.

- [34] FUJII S, MIURA Y. Immunomodulatory and regenerative effects of MSC-derived extracellular vesicles to treat acute GVHD [J]. *Stem Cells*, 2022, 40(11): 977-90.
- [35] ZHOU T, HE C, LAI P, et al. miR-204-containing exosomes ameliorate GVHD-associated dry eye disease [J]. *Sci Adv*, 2022, 8(2): eabj9617.
- [36] LI K L, LI J Y, XIE G L, et al. Exosomes released from human bone marrow-derived mesenchymal stem cell attenuate acute graft-versus-host disease after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation in mice [J]. *Front Cell Dev Biol*, 2021, 9: 617589.
- [37] ZHANG B, YEO R W Y, LAI R C, et al. Mesenchymal stromal cell exosome-enhanced regulatory T-cell production through an antigen-presenting cell-mediated pathway [J]. *Cytotherapy*, 2018, 20(5): 687-96.
- [38] AMARNATH S, FOLEY J E, FARTHING D E, et al. Bone marrow-derived mesenchymal stromal cells harness purinergic signaling to tolerize human Th1 cells *in vivo* [J]. *Stem cells*, 2015, 33(4): 1200-12.
- [39] FUJII S, MIURA Y, FUJISHIRO A, et al. Graft-versus-host disease amelioration by human bone marrow mesenchymal stromal/stem cell-derived extracellular vesicles is associated with peripheral preservation of naive T cell populations [J]. *Stem Cells*, 2018, 36(3): 434-45.
- [40] ZHU H, LAN L, ZHANG Y, et al. Epidermal growth factor stimulates exosomal microRNA-21 derived from mesenchymal stem cells to ameliorate aGVHD by modulating regulatory T cells [J]. *FASEB J*, 2020, 34(6): 7372-86.
- [41] Erratum to "Epidermal growth factor stimulates exosomal microRNA-21 derived from mesenchymal stem cells to ameliorate aGVHD by modulating regulatory T cells" [J]. *FASEB J*, 2023, 37(7): e22990.
- [42] LAI P, CHEN X, GUO L, et al. A potent immunomodulatory role of exosomes derived from mesenchymal stromal cells in preventing cGVHD [J]. *J Hematol Oncol*, 2018, 11(1): 135.
- [43] NOROOZNEZHAD A H, YARANI R, PAYANDEH M, et al. Human placental mesenchymal stromal cell-derived exosome-enriched extracellular vesicles for chronic cutaneous graft-versus-host disease: a case report [J]. *J Cell Mol Med*, 2022, 26(2): 588-92.
- [44] LIU W, ZHOU N, LIU Y, et al. Mesenchymal stem cell exosome-derived miR-223 alleviates acute graft-versus-host disease via reducing the migration of donor T cells [J]. *Stem Cell Res Ther*, 2021, 12(1): 153.
- [45] WANG L, GU Z, ZHAO X, et al. Extracellular vesicles released from human umbilical cord-derived mesenchymal stromal cells prevent life-threatening acute graft-versus-host disease in a mouse model of allogeneic hematopoietic stem cell transplantation [J]. *Stem Cells Dev*, 2016, 25(24): 1874-83.
- [46] KAVIAN N, MARUT W, SERVETTAZ A, et al. Arsenic trioxide prevents murine sclerodermatous graft-versus-host disease [J]. *J Immunol*, 2012, 188(10): 5142-9.
- [47] LIU X, SU Y, SUN X, et al. Arsenic trioxide alleviates acute graft-versus-host disease by modulating macrophage polarization [J]. *Sci China Life Sci*, 2020, 63(11): 1744-54.
- [48] AN K, XUE M J, ZHONG J Y, et al. Arsenic trioxide ameliorates experimental autoimmune encephalomyelitis in C57BL/6 mice by inducing CD4<sup>+</sup> T cell apoptosis [J]. *J Neuroinflammation*, 2020, 17(1): 147.
- [49] BASSO P J, SALES-CAMPOS H, NARDINI V, et al. Peroxisome proliferator-activated receptor alpha mediates the beneficial effects of atorvastatin in experimental colitis [J]. *Front Immunol*, 2021, 12: 618365.
- [50] LI C, ZHANG J, WANG W, et al. Arsenic trioxide improves Treg and Th17 balance by modulating STAT3 in treatment-naïve rheumatoid arthritis patients [J]. *Int Immunopharmacol*, 2019, 73: 539-51.
- [51] HAMIDOU M, NÉEL A, POUPON J, et al. Safety and efficacy of low-dose intravenous arsenic trioxide in systemic lupus erythematosus: an open-label phase IIa trial (Lupsenic) [J]. *Arthritis Res Ther*, 2021, 23(1): 70.
- [52] SUN Y, SHI H, YIN S, et al. Human mesenchymal stem cell derived exosomes alleviate type 2 diabetes mellitus by reversing peripheral insulin resistance and relieving  $\beta$ -cell destruction [J]. *ACS Nano*, 2018, 12(8): 7613-28.
- [53] YANG C, SUN J, TIAN Y, et al. Immunomodulatory effect of MSCs and MSCs-derived extracellular vesicles in systemic lupus erythematosus [J]. *Front Immunol*, 2021, 12: 714832.
- [54] YOU D G, LIM G T, KWON S, et al. Metabolically engineered stem cell-derived exosomes to regulate macrophage heterogeneity in rheumatoid arthritis [J]. *Sci Adv*, 2021, 7(23): eabe0083.
- [55] WENG Z, ZHANG B, WU C, et al. Therapeutic roles of mesenchymal stem cell-derived extracellular vesicles in cancer [J]. *J Hematol Oncol*, 2021, 14(1): 136.
- [56] RIAZIFAR M, MOHAMMADI M R, PONE E J, et al. Stem cell-derived exosomes as nanotherapeutics for autoimmune and neurodegenerative disorders [J]. *ACS Nano*, 2019, 13(6): 6670-88.